

# Entwicklung eines neuen Assays zum Nachweis der humanen Telomerase

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie / Molekularbiologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Lora Dimitrova

geboren am 14.07.1976 in Sofia

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:       1. Prof. Dr. Thomas Börner  
                      2. Prof. Dr. Harald Saumweber  
                      3. Prof. Dr. Thomas von Zglinicki

eingereicht:       01.09.2008

Datum der Promotion: 17.12.2008

## Zusammenfassung

Die Telomere sind spezialisierte DNA-Protein-Komplexe, die sich an den Enden der Chromosomen der eukaryotischen Zellen befinden. Es wird angenommen, dass die progressive Verkürzung der Telomere nach jeder Zellteilung [1,2,3], die Grundlage für die begrenzte Lebensdauer von normalen humanen Zellen ist [4]. Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, welches für die vollständige Replikation der Telomere bei den meisten Eukaryoten verantwortlich ist [5]. Die katalytische Untereinheit des Enzyms (hTERT beim Menschen) besitzt Reverse-Transkriptase-Aktivität, und nutzt eine integrierte RNA (hTR beim Menschen) als Template, um Telomer-Wiederholungssequenzen an den Enden der Chromosomen zu synthetisieren [6,7,8,9,10,11]. Die Telomerase ist in den meisten normalen humanen somatischen Zellen unterdrückt. In den meisten Krebszellen jedoch, stellt die Reaktivierung der Telomerase zur Beibehaltung der Telomerlänge eine Voraussetzung für deren unbegrenztes Wachstumspotential dar [12,13,14,15,16,17].

Die Bestimmung der Telomerase-Aktivität kann **(1)** der Früherkennung von malignen Tumoren dienen, bei welchen die Telomerase-Aktivität in den frühen Stadien hochreguliert wird, **(2)** als Malignitätsmarker bei Tumoren eingesetzt werden, bei denen die maligne Form von der benignen manchmal morphologisch nicht unterscheidbar ist, sowie **(3)** einen prognostischen Indikator bei Tumoren darstellen, deren Telomerase-Aktivität während des Tumorswachstums hochreguliert wird.

Die Telomerase-Aktivität wird am häufigsten mit dem PCR-basierten TRAP-Assay (*Telomere Repeat Amplification Protocol*) nachgewiesen [18].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neuer, einfacher und selektiver Assay für den Nachweis der humanen Telomerase entwickelt werden. Im Gegensatz zu dem TRAP-Assay, bei welchem die Aktivität des Enzyms bestimmt wird, sollten in dem neuen Assay die beiden Kernkomponenten der Telomerase, die Protein-Untereinheit und die fest mit ihr verknüpfte RNA, die Targets sein.

Der im Verlauf dieser Arbeit entwickelte Test ist in seiner Grundstruktur wie folgt aufgebaut :

1. Bindung der Telomerase über die hTERT an einer Festphase. Die Bindung erfolgte über eine Oberfläche, beschichtet mit Phosphorothioat-modifizierten (PS) Oligonukleotiden oder Heparin. Zusammen mit der Telomerase werden bei diesem Schritt die Heparin-bindenden Proteine an der Festphase immobilisiert [19].

2. Spezifischer Nachweis der hTR. Dazu wird ein Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) oder eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) eingesetzt.

In der optimierten Endversion wurde zur Immobilisierung des Enzyms eine Festphase, beschichtet mit PS-Oligonukleotiden, verwendet. Die hTR wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Mit dem entwickelten Assay gelang die Detektion von 75 Tumorzellen. Hiermit ist er in seiner Sensitivität vergleichbar mit den zur Zeit verwendeten funktionellen Nachweismethoden der humanen Telomerase.

**Schlagwörter :**

hTERT

hTR

Oligonukleotid-Ligations-Assay

Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide

Reverse-Transkriptase-PCR

Telomerase

TRAP

## Abstract

Telomeres are specialized DNA-Protein structures located at the ends of linear chromosomes. The progressive shortening of telomeres after each cell division due to the “end replication problem” [1,2,3] is believed to be the basis for limited life-span of normal human cells [4]. Telomerase is a ribonucleoprotein which is responsible for the complete replication of the telomeres in most eukaryotes [5]. The catalytic reverse transcriptase protein subunit (hTERT in humans) of the nucleoprotein uses an integral RNA (hTR in humans) as a template for the addition of telomeric repeat sequences to the ends of chromosomes [6,7,8,9,10,11]. Telomerase is repressed in most normal human somatic cells, while the reactivation of telomerase to maintain telomere length is necessary for the unlimited growth potential of most human cancer cells [12,13,14,15,16,17].

Telomerase activity measurements have clinical utilities **(1)** for early detection of cancer cells for diagnosis of malignant tumors whose telomerase activity is upregulated in early stages, **(2)** as a marker of malignancy in the group of tumors in which benign and malignant tumors are sometimes indistinguishable by morphological examination, **(3)** as a prognostic indicator in tumors whose telomerase is activated according to tumor progression.

The most widely used strategy for detecting telomerase activity is the TRAP (*Telomere Repeat Amplification Protocol*) assay [18].

The aim of this work was the development of a new, simple and selective assay for the detection of human telomerase. In the TRAP assay the activity of telomerase is determined, whereas the targets of the new assay were the two core subunits of the enzyme : hTERT and hTR.

The test comprises two principal steps :

1. Immobilization of the enzyme via the hTERT subunit on a solid phase, coated with heparin or phosphorothioate-modified (PS) oligonucleotides. In this step telomerase is bound together with the other heparin-binding proteins of the analysed sample to the surface [19].
2. Specific detection of the hTR. For the detection of the hTR an oligonucleotide ligation assay (OLA) or a reverse transcriptase PCR (RT-PCR) is used.

In the optimized final version of the assay a PS-coated solid phase was used for the immobilization of the enzyme. Reverse transcriptase PCR was applied for detection of the hTR. 75 tumor cells were successfully detected with the new assay.

The sensitivity of the developed assay is comparable with the sensitivity of the other telomerase detection assays.

**Keywords :**

hTERT

hTR

oligonucleotide ligation assay

phosphorothioate-modified oligonucleotides

reverse transcriptase PCR

telomerase

TRAP

## Abkürzungsverzeichnis

AMV RT	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i> Reverse Transkriptase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddC	2',3'-Didesoxycytidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
hTR	Humane Telomerase-RNA
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IS	Interner Standard
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
OLA	Oligonukleotid-Ligations-Assay
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )

PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PNA	Peptid-Nukleinsäure ( <i>peptide nucleic acid</i> )
PS	Phosphorothioat-modifiziert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
T <sub>a</sub>	Annealing-Temperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Telomerase Substrat-Primer

## Inhaltsverzeichnis

<i><b>Zusammenfassung.....</b></i>	<i><b>I</b></i>
<i><b>Abstract.....</b></i>	<i><b>III</b></i>
<i><b>Abkürzungsverzeichnis .....</b></i>	<i><b>V</b></i>
<i><b>1      Einleitung.....</b></i>	<i><b>1</b></i>
1.1    Telomere .....	1
1.2    DNA-Replikation bei Eukaryonten und das End-Replikations-Problem .....	4
1.3    Telomerase .....	8
1.4    Nachweismethoden für die Telomerase .....	12
1.5    Telomerase und Krebs .....	16
1.6    Telomerase als diagnostischer und prognostischer Marker .....	18
1.7    Telomerase-Inhibitoren.....	19
1.8    Zielsetzung der Arbeit.....	22
<i><b>2      Material und Methoden.....</b></i>	<i><b>26</b></i>
2.1    Material.....	26
2.1.1    Geräte .....	26
2.1.2    Chemikalien .....	27
2.1.3    Verbrauchsmaterial.....	28
2.1.4    Enzyme.....	28
2.1.5    Kits.....	29
2.1.6    DNA- und Protein-Leitern .....	29
2.1.6.1    DNA-Leitern .....	29
2.1.6.2    Protein-Leitern .....	29
2.1.7    Antikörper .....	29
2.1.7.1    Primäre anti-Telomerase Antikörper .....	29
2.1.7.2    Sekundäre Antikörper .....	30
2.1.8    Oligonukleotide.....	30



2.1.9	Puffer.....	31
2.1.10	Humane Zelllinien.....	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.2.1	Allgemeine Methoden.....	35
2.2.1.1	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	35
2.2.1.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	35
2.2.1.3	SYRB®-Gold Färbung .....	36
2.2.1.4	RNA-Isolierung.....	36
2.2.1.5	Sequenzierung.....	37
2.2.1.6	Auswertung der Abbildungen mit dem Programm Image J.....	37
2.2.2	Zellbiologische Arbeiten.....	37
2.2.2.1	Anzucht der HL-60 Zellen.....	37
2.2.2.2	Herstellung von HUVEC-Zellpellets.....	37
2.2.3	Molekularbiologische Arbeiten.....	38
2.2.3.1	Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) mit der Positivkontrolle (3'-blocked tDNA) und einem ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (1:1) .....	38
2.2.3.2	Vergleich von OLA und OLA+ΔT für die Verhältnisse 3'-blocked tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (6:1:1) und (6:1:2) .....	38
2.2.3.3	OLA mit der 3'-blocked tDNA und einem ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (1:2).....	39
2.2.3.4	OLA mit der aufgereinigten Telomerase bei gleichbleibender Telomerase-Menge .....	40
2.2.3.5	OLA mit der aufgereinigten Telomerase bei gleichbleibender Ligationsprimer-Menge .....	41
2.2.3.6	Modifizierter OLA mit der hTR und den β-ras-TR/Donor-U4-ras bzw. β-ras-Akzeptor(N)/(N)Donor-ras Ligationsprimerpaaren.....	42
2.2.3.7	ras-PCR (Gradienten-PCR) mit genomischer DNA und Taq DNA Polymerase.....	44
2.2.3.8	ras-PCR mit Taq DNA Polymerase.....	45
2.2.3.9	ras-PCR (Gradienten-PCR) mit Hot Start Taq DNA Polymerase.....	45
2.2.3.10	ras-PCR mit Hot Start Taq DNA Polymerase .....	46

2.2.3.11	Test des HL-60-Lysats auf DNasen .....	46
2.2.3.12	DNaseI-Verdau.....	47
2.2.3.13	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	47
2.2.3.13.1	cDNA-Herstellung.....	47
2.2.3.13.2	PCR zur Amplifikation der cDNA.....	48
2.2.3.14	Optimierung der Beschichtung der NeutrAvidin™Protein Plus Beads mit $\beta$ -20n/PS .....	49
2.2.3.15	Direkter Telomerase-Assay mit dem HL-60-Lysat.....	49
2.2.3.16	Ein-Schritt TRAP-Assay mit Taq DNA Polymerase .....	49
2.2.3.17	Direkter TRAP-Assay mit Hot Start Taq DNA Polymerase .....	50
2.2.3.18	Zwei-Schritt TRAP-Assay mit Hot Start Taq DNA Polymerase .....	50
2.2.3.19	TRAP-Assay mit dem ras-TSL als Substrat .....	51
2.2.3.20	TRAP-Assay zur Bestimmung der $\beta$ -20n/PS-Menge, benötigt zur Hemmung der Telomerase aus 1 $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt.....	52
2.2.4	Proteinbiochemische Arbeiten .....	53
2.2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	53
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
2.2.4.3	Western-Blot Analyse .....	54
2.2.4.4	Herstellung von $\ddot{U}_{100}$ -Lysaten aus HL-60 Zellen.....	55
2.2.4.5	Herstellung von Jurkat- und HUVEC-Lysaten .....	55
2.2.4.6	Aufreinigung der Telomerase aus HL-60 Zellen mittels FPLC.....	55
2.2.4.7	Optimierte Aufreinigung der Telomerase aus HeLa-Zellkernextrakt .....	57
2.2.4.8	Immobilisierung der Telomerase an Heparin-Sepharose .....	58
2.2.4.9	Bindung der Telomerase an die NeutrAvidin™Protein Plus Beads, beschichtet mit $\beta$ -20n/PS .....	59
2.2.4.10	Optimierte Bindung der Telomerase an NeutrAvidin™Protein Plus Beads, beschichtet mit $\beta$ -20n/PS .....	60
2.2.4.11	Bindung der Telomerase an die NeutrAvidin™Protein Plus Beads, beschichtet mit $\beta$ -20n/PS, unter 1 M KCl.....	61
2.2.4.12	Assay zum Nachweis der humanen Telomerase (Telomerase-Assay).....	62
2.2.4.13	Telomerase-Assay mit neuen Versuchsbedingungen .....	63
2.2.4.14	Endversion des Telomerase-Assays .....	64

<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>66</b>
<b>3.1</b>	<b>Wahl der Telomerase-Quelle für die Entwicklung des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase</b>	<b>66</b>
3.1.1	Ü <sub>100</sub> -Lysate	66
3.1.2	Aufreinigung der Telomerase	69
<b>3.2</b>	<b>Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA)</b>	<b>74</b>
3.2.1	Test des ras-TSL als Substrat für die Telomerase	74
3.2.2	Ermittlung der Reaktionsbedingungen für den OLA mit Hilfe eines synthetischen Templates	76
3.2.3	OLA mit aufgereinigter Telomerase	83
3.2.4	Optimierung der ras-PCR mit genomischer DNA	85
3.2.5	Optimierung der ras-PCR mit der Positivkontrolle	86
3.2.5.1	ras-PCR mit Taq DNA Polymerase	86
3.2.5.2	ras-PCR mit Hot Start Taq DNA Polymerase	87
3.2.5.3	Ursache für die PCR-Artefakte	89
3.2.6	OLA mit der Telomerase-RNA (hTR)	90
3.2.6.1	Isolierung von HeLa-RNA und Nachweis der hTR mittels Reverse-Transkriptase-PCR	92
3.2.6.2	Modifizierter OLA mit $\beta$ -ras-TR und Donor-U4-ras bzw. $\beta$ -ras-Akzeptor(N) und (N)Donor-ras	94
<b>3.3</b>	<b>Immobilisierung der Telomerase an die Festphase</b>	<b>96</b>
3.3.1	Immobilisierung der Telomerase an Heparin-Sepharose	96
3.3.2	Bindung der Telomerase aus HeLa-Zellkernextrakt an <i>Beads</i> , beschichtet mit Phosphorothioat-modifizierten (PS)-Oligonukleotiden	100
3.3.2.1	Bestimmung der benötigten $\beta$ -20n/PS-Menge	101
3.3.2.2	Optimierung der Beschichtung der Beads	102
3.3.2.3	Bindung der Telomerase an die beschichteten Beads	104
<b>3.4</b>	<b>Nachweis der Telomerase mit Phosphorothioat-modifizierten (PS) Oligonukleotiden und Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR)</b>	<b>106</b>
3.4.1	Optimierung der Bindung der Telomerase an die beschichteten <i>Beads</i>	106

3.4.2	Telomerase-Assay mit Zelllysaten und Ermittlung der Nachweisgrenze der entwickelten Methode .....	111
3.4.2.1	Herstellung der Jurkat-Lysate und Telomerase-Assay mit den neuen Bedingungen .....	111
3.4.2.2	Bindung der Telomerase an die beschichteten Beads unter 1 M KCl.....	114
3.4.2.3	Assay zum Nachweis der humanen Telomerase in seiner Endversion .....	116
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>122</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Telomerase-Quelle für die Entwicklung des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase</b> .....	<b>122</b>
<b>4.2</b>	<b>Immobilisierung der Telomerase an die Festphase</b> .....	<b>124</b>
4.2.1	Immobilisierung der Telomerase an Heparin-Sepharose .....	124
4.2.2	Immobilisierung der Telomerase an <i>Beads</i> , beschichtet mit Phosphorothioat-modifizierten (PS) Oligonukleotiden .....	125
<b>4.3</b>	<b>Nachweis der hTR</b> .....	<b>127</b>
4.3.1	Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) .....	127
4.3.1.1	OLA mit der 3'-blocked tDNA .....	127
4.3.1.2	OLA mit der Telomerase .....	129
4.3.1.3	Modifizierter OLA mit der hTR .....	132
4.3.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) .....	136
<b>4.4</b>	<b>Neuer Assay zum Nachweis der humanen Telomerase</b> .....	<b>136</b>
<b>4.5</b>	<b>Aussichten</b> .....	<b>142</b>
<b>5.</b>	<b><i>Literatur</i></b> .....	<b>153</b>
	<b><i>Publikationsliste</i></b> .....	<b>XII</b>
	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>XIII</b>
	<b><i>Eidesstattliche Erklärung</i></b> .....	<b>XIV</b>

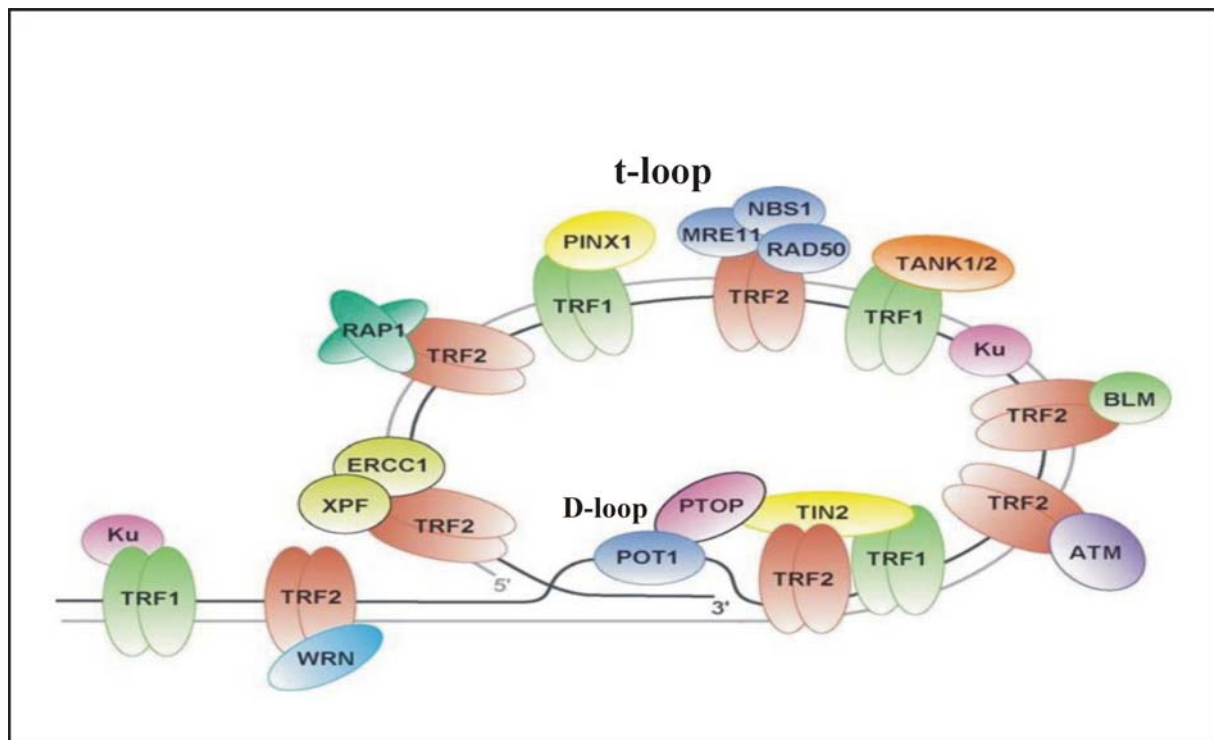
# 1 Einleitung

## 1.1 Telomere

Das Telomer ist die besondere Struktur an den Enden der linearen Chromosomen von eukaryotischen Lebewesen [20]. Die Telomere schützen die Chromosomen vor Rekombination, End-zu-End Fusion und vor der Erkennung als beschädigte DNA. Außerdem tragen sie zu der funktionellen Organisation der Chromosomen innerhalb des Kerns bei, nehmen an der Regulation der Genexpression teil und dienen als molekulare Uhr, welche die replikative Kapazität der humanen Zelle und deren Eintritt in die Seneszenz kontrolliert [21].

Das Telomer ist ein komplexes Nukleoprotein, welches Einzelstrang- sowie Doppelstrang-DNA und assoziierte Proteine enthält, die miteinander interagieren [22]. Die Telomere bestehen aus typischen DNA Wiederholungssequenzen (*repeats*), welche in der Evolution hochkonserviert sind. Beim Menschen hat die repetitive DNA die Sequenz 5'-TTAGGG-3'. Die Telomerlänge ist speziesspezifisch. Bei *Saccharomyces cerevisiae* ist die durchschnittliche Länge der Telomere ungefähr 300 Bp, die meisten Maus-Stämme haben sehr lange Telomere (20-150 kBp), und beim Menschen sind sie 5-15 kBp lang. Es können leichte Variabilitäten innerhalb der Spezies vorkommen, sowie Schwankungen verursacht durch die Art des Gewebes, das Alter und den normalen oder pathologischen Zustand der Zellen [23]. Der G-reiche Strang, fortlaufend vom 5'- zum 3'-Chromosomen-Ende, ist länger als sein komplementärer C-reicher Strang und auf diese Weise wird ein einzelsträngiger Überhang an seinem 3'-Ende gebildet. Der 3'-Überhang ist essentiell für die Bildung des t-loops (*telomere loop*), bei welcher der 3'-Überhang in die doppelsträngige Telomer-Region eingefügt wird. Vermutlich werden auf diese Weise die Chromosomen-Enden davor geschützt, als beschädigte DNA erkannt zu werden und die Genom-Stabilität erhalten [24,25,26]. Bei dem Einfügen des 3'-Überhangs in die doppelsträngige Telomer-DNA wird an der Stelle des Einfügens ein D-loop (*displacement loop*) gebildet [27].

Der t-loop wurde bei Säugetieren [28,29,30], Hühnern [30] und Ciliaten [31,32] beobachtet. Es ist nicht geklärt, wie groß der Anteil an Chromosomen-Enden ist, die diese Struktur annehmen [33]. In **Abb. 1** ist der t-loop schematisch dargestellt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des t-loops. Die DNA und die assoziierten Proteine bilden ein funktionelles Telomer: Detaillierte Erläuterungen im Text (modifiziert nach [22]).

Als erstes Telomer-bindendes Protein bei Säugetieren wurde TRF1 (*Telomere Repeat-binding Factor*) beschrieben [34]. Beim Menschen können die telomeren Proteine spezifisch Doppelstrang-DNA sowie einzelsträngige Telomer-DNA binden, oder über andere telomere Proteine interagieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Telomerlänge, Integrität und Funktion. Zum TRF1-Komplex gehören TIN2, PTOP und POT1, und dieser Komplex reguliert die Telomerlängen-Homöostase [35]. TRF1 ist ein Homodimer, welches mit der doppelsträngigen TTAGGG-Sequenz des t-loops assoziiert. Eine Reihe von Proteinen interagieren mit TRF1 und regulieren somit die Telomerlänge. Tankyrase 1 (*TRF-interacting ankyrin-related poly-(ADP-ribose)-polymerase 1*) und Tankyrase 2 (*TRF-interacting ankyrin-related poly-(ADP-ribose)-polymerase 2*), welche positive Regulatoren der Telomerlänge sind [36], binden und modifizieren TRF1. Diese Enzyme führen zu einer ADP-Ribosylierung des Proteins und hemmen dadurch die Bindung von TRF1 an die Telomer-DNA [37]. *In vitro* wird die ADP-Ribosylierung von einem zweiten Interaktionspartner von TRF1, TIN2 (*TRF1-Interacting Nuclear 2 protein*), verhindert. TIN2 scheint auch *in vivo* TRF1 vor der Tankyrase zu schützen. Die Bindung von TRF1 an TIN2 dient zur negativen

Regulation der Telomerlänge, wahrscheinlich da sie zu einer Verdichtung der Telomer-DNA und Stabilisierung des t-loops führt [38,39]. Eine weitere Funktion von TIN2 ist PTOP (*POT1 and TIN2 Organizing Protein*) mit dem TRF1-Komplex zu verbinden. PTOP ist ein POT1 (*Protection Of Telomeres 1*)-interagierendes Protein, welches die Bindung von POT1 an den TRF1-Komplex vermittelt [40,41]. Das humane POT1 (hPOT1) scheint mit den Telomeren durch direkte Bindung am 3'-Überhang zu interagieren, sowie durch eine Interaktion mit dem TRF1-Komplex [42]. hPOT reguliert die Telomerlänge in einer positiven, als auch negativen Weise. Ye et al. haben gezeigt, dass das Herabsetzen der endogenen hPOT1 Levels durch RNA-Interferenz zu einer Verlängerung der Telomere führt, was darauf schließen lässt, dass hPOT1 die Telomerlänge in einer negativen Weise reguliert [41]. Andererseits wurde bei der Überexpression von hPOT1 in Telomerase-positiven Zellen nach vielen Passagen in Kultur beobachtet, dass in einem Teil der Klone die Telomere wesentlich verlängert waren. Dies führte zu dem Schluss, dass hPOT1 ein Telomerase-abhängiger, positiver Regulator der Telomerlänge darstellt [43].

Ein dritter direkter Interaktionspartner von TRF1 ist PINX1 (*PIN2-Interacting Protein 1*) [44]. TRF1 geht auch Bindungen mit Ku [45], der BLM (*Bloom Syndrome*) RecQ Helikase [46,47] und der ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*) Kinase [48,49] ein.

Ein weiteres Protein, TRF2, wurde als TRF1-Paralog identifiziert [50,51]. TRF2 spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz der Telomere [25]. Wie TRF1 bindet es doppelsträngige Telomer-DNA, und beide Proteine sind negative Regulatoren der Telomerlänge [52]. TRF2 wurde im doppelsträngigen Teil des t-loops, sowie an der *loop-tail* Verbindung nachgewiesen. Seine Lokalisierung deutet auf eine Rolle bei der Stabilisierung der Überhang-Struktur im t-loop [53]. TRF2 bildet einen Komplex mit hRAP1 [54] und assoziiert mit mehreren Proteinen, welche in dem DNA-Reparatursystem involviert sind. Zu diesen Proteinen gehören der RAD50/MER11/NBS1-Komplex [55,56,57], sowie die ERCC/XPF Nukleotid-Exzisions-Reparatur-Endonuklease [58]. Es wurde gezeigt, dass TRF2 die ATM Kinase, die WRN (*Werner Syndrome*) RecQ Helikase, die BLM RecQ Helikase und den DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PK) Komplex bindet. TRF1 und TRF2 interagieren miteinander mittels TIN2 [41,59].

## 1.2 DNA-Replikation bei Eukaryonten und das End-Replikations-Problem

In eukaryontischen Zellen wird die DNA-Replikation an multiplen Stellen innerhalb des Chromosomes initiiert. An jeder dieser Stellen muss die Replikations-Maschinerie zusammengestellt werden, um den entsprechenden Bereich des Chromosoms vollständig und mit hoher Genauigkeit zu replizieren. Die Zusammenstellung der Replikationsgabel erfolgt auf Wegen, welche von der Hefe bis zu der Säugetierzelle grundsätzlich konserviert sind [60]. Vom Replikationsursprung schreitet die Replikation bidirektional in die angrenzende DNA fort. Um die gleichzeitige Synthese der beiden neuen Stränge zu erreichen findet eine halbdiskontinuierliche Replikation statt [61]. Aufgrund der antiparallelen Struktur der DNA, wird einer der beiden neusynthetisierten Stränge kontinuierlich in Richtung der Fortbewegung der Replikationsgabel synthetisiert. Dieser Strang wird als *leading strand* bezeichnet [62]. Bei dem anderen Strangs, dem *lagging strand*, wird die DNA in Richtung entgegengesetzt des Fortschreitens der Replikationsgabel synthetisiert. Der *lagging strand* wird diskontinuierlich, als eine Serie aus diskreten Okazaki-Fragmenten synthetisiert, welche schließlich ligiert werden um einen ununterbrochenen DNA-Strang zu bilden [63].

Mindestens drei DNA-Polymerasen werden für die Replikation des eukaryontischen Genoms benötigt : DNA-Polymerase alpha (Pol  $\alpha$ ), DNA-Polymerase delta (Pol  $\delta$ ) und DNA-Polymerase epsilon (Pol  $\epsilon$ ) [60]. Pol  $\alpha$  hat die einzigartige Fähigkeit die DNA-Replikation zu initiieren, da sie in ein und demselben Komplex, welcher aus vier Untereinheiten besteht, eine Primase- sowie DNA-Polymerase-Aktivität vereint. Die Untereinheit-Struktur dieses heterotetrameren Enzyms ist in allen Organismen konserviert [64,65]. Pol  $\alpha$  initiiert die DNA-Synthese an *leading* sowie *lagging strand* durch die Synthese eines RNA/DNA Hybrid-Primers. Pol  $\delta$  und Pol  $\epsilon$  verlängern dann diesen Primer [63]. Pol  $\delta$  ist an der Synthese des *lagging strands* beteiligt [60], während neueste Studien den ersten direkten Nachweis lieferten, dass in *S.cerevisiae* Pol  $\epsilon$  an der Synthese des *leading strands* Teil nimmt [66]. Um den *lagging strand* zu synthetisieren wird die wiederholte Synthese von RNA/DNA-Primern von der Pol  $\alpha$  benötigt. Anschließend findet eine DNA-Polymerasen Umschaltung statt, und der Primer wird von Pol  $\delta$  verlängert. Diese prozessive Synthese wird mindestens bis zum 5'-Ende des vorherigen Okazaki-Fragments fortgesetzt. An diesem Punkt findet Okazaki-Fragment-Processing statt, um dieses neusynthetisierte Fragment mit dem aufeinanderfolgenden zu verbinden [63].



Bei der Replikation von linearen DNA Molekülen wird das 3'-Ende des entstehenden Stranges durch *leading strand*-Synthese erzeugt, während die Synthese des 5'-Ende durch *lagging strand*-Synthese erfolgt. Anfang der 70er Jahre stellten Watson und Olovnikov unabhängig voneinander die Hypothese auf, welche als End-Replikations-Problem bekannt ist. Sie postulierten, dass die *lagging strand*-Synthese von linearen DNA-Templates aus zwei Gründen unvollständig sein würde [1,2]. Erstens gibt es keinen bekannten Mechanismus, der gewährleistet, dass das letzte Okazaki-Fragment am äußersten Endes des Template-Moleküls positioniert wird. Folglich würde die Template-Sequenz zwischen dem Ende und dem Okazaki-Fragment nicht repliziert werden. Zweitens ist kein Mechanismus bekannt, der den äußersten RNA-Primer mit DNA ersetzen kann. Infolgedessen würde die Sequenz des äußersten RNA-Primers im Tochterstrang verloren gehen. Aus diesem Grund sollte DNA von den Chromosomen-Enden bei jeder Zellteilung progressiv verloren gehen.

Im Gegensatz zur *lagging strand*-Synthese, wird bei der *leading strand*-Synthese angenommen, dass sie bis zum äußersten Ende des Templates stattfindet. In einem *in vitro* Replikationssystem konnte experimentell bestätigt werden, dass der neusynthetisierte *leading-strand* ein Blunt-Ende hat [67].

Hypothetische Nukleasen oder Helikasen könnten dann beide chromosomalen Enden prozessieren, um längere Überhänge zu erzeugen [68,69]. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, dass bei Hefen und Ciliaten Überhänge an beiden Chromosomen-Enden nachgewiesen werden konnten [70,71,72,73,74]. Die humanen Telomere haben 3'-Überhänge, welche um Größenordnungen länger sind, als die der Modellorganismen [75,76,77,78,79]. Die Nukleasen, die für die Prozessierung des Telomer-Endes verantwortlich sind, sind jedoch unbekannt.

Übereinstimmend mit dieser Hypothese von Watson und Olovnikov wurde die Telomer-Verkürzung mit fortschreitender Zellteilung *in vitro* und zunehmendem Alter *in vivo* beobachtet [3,80,81,82].

Zusätzlich deuten verschiedene Studien darauf hin, dass oxidativer Stress zur Telomer-Verkürzung beiträgt [83,84,85,86,87]. Oxidativer Stress induziert effizient einen DNA-Schaden auf der 5'-Seite der 5'-GGG-3' Sequenz in der telomeren Sequenz. Dies weist darauf

hin, dass er Spaltungen speziell an Polyguanosin-Sequenzen in der Telomer-Sequenz verursachen kann [88,89].

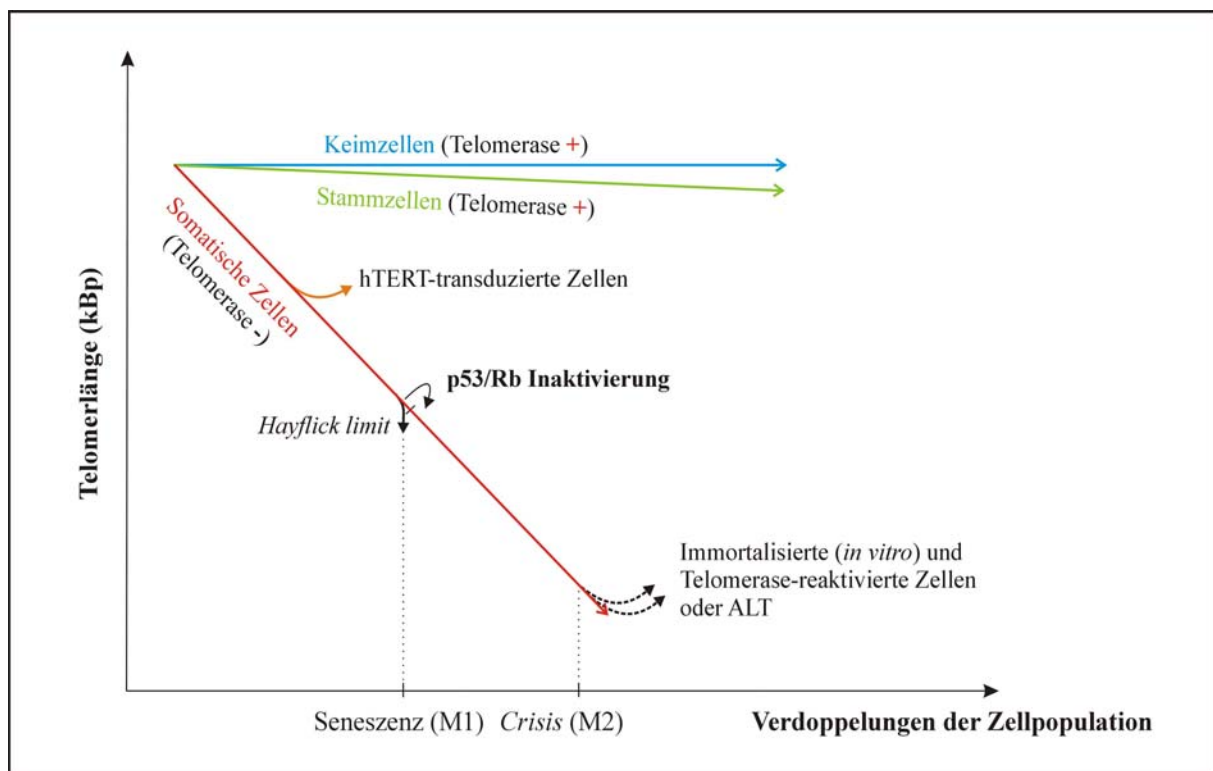
Petersen et al. [90] und von Zglinicki et al. [91] haben gezeigt, dass unter Bedingungen von zusätzlichem oxidativen Stress, hervorgerufen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung, in humanen Fibroblasten bevorzugt Anhäufungen von Einzelstrangbrüchen in den Telomeren entstehen. Die Reparatur der Einzelstrangbrüche [90] und in gewissem Grade des UV-verursachten Schadens [92] ist in den Telomeren erheblich weniger effizient als in dem Hauptteil des Genoms. Während der DNA-Replikation stoppen die beschädigten Stellen vorübergehend die Polymerasen. In den Telomeren könnte dies zu einer vorzeitigen Termination der Replikation und zu einer stärkeren Telomer-Verkürzung führen, im Vergleich zu der Telomer-Verkürzung, die nur von dem End-Replikations-Problem allein verursacht würde [93].

Normale somatische Säugetierzellen proliferieren *in vitro* in begrenzten Anzahl. Die maximale Teilungszahl wird als *Hayflick limit* bezeichnet [94]. Wenn das *Hayflick limit* erreicht ist, lösen ein oder mehrere kritisch verkürzte Telomere einen dauerhaften Wachstumsarrest, welcher als replikative Seneszenz oder *mortality stage 1* (M1) bezeichnet wird, aus [95,96,97]. Um die Seneszenz zu umgehen, müssen humane Zellen den p53- sowie Rb-Signalweg inaktivieren [98], während bei Mauszellen nur einer von beiden Signalwegen inaktiviert werden muss [99]. Zellpopulationen, welche die replikative Seneszenz durch Inaktivierung umgehen, teilen sich weiter, bis ihre Telomere kritisch kurz werden und sie nicht mehr in der Lage sind die Chromosomenenden vor dem zellulären DNA-Reparatursystem zu schützen. An dieser Stelle hat die Zellpopulation eine zweite Proliferationsschranke, welche *crisis* oder *mortality stage 2* (M2) genannt wird, erreicht. Dieser Zustand wird durch kurze Telomere, End-zu-End-Fusionen der Chromosomen, Anaphasen-Brücken und Zelltod, ausgelöst durch Apoptose, charakterisiert [4,100]. *Crisis* unterscheidet sich von der Seneszenz in zwei wesentlichen Punkten : a) es wird überhandnehmende genomische Instabilität beobachtet, welche mit b) weitverbreitetem Zelltod assoziiert ist.

Gelegentlich gelingt es jedoch einem seltenen Zellklon (1 in 10<sup>7</sup> humanen Zellen) auch diesen Kontrollpunkt zu umgehen. Solche Klone sind in der Lage ihre Telomerlänge zu erhalten und sind immer unsterblich [4]. In den meisten Fällen wird die Telomerlänge durch die

Aktivierung der Expression des Enzyms Telomerase erhalten. In denjenigen Klonen, in denen die Telomerase-Expression nicht aktiviert wird, wird die Telomerlänge mittels eines Mechanismus, genannt ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*), erhalten. Über 90 % aller menschlicher Tumoren verwenden die Telomerase um ihre Telomerlänge zu erhalten, während der Telomerase-unabhängige ALT-Mechanismus in nur 7-10 % der Tumoren beobachtet wurde [12,101].

Diese Zusammenhänge werden in **Abb. 2** dargestellt.



**Abb. 2:** Die Telomer-Telomerase-Hypothese. In Keimzellen erhält die endogene Telomerase die Telomerlänge auf einen Wert von 15-20 kbp. Normale somatische Zellen exprimieren keine oder sehr schwach endogene Telomerase, und ihre Telomerlänge wird mit jeder Zellteilung progressiv kürzer. Pluripotente Stammzellen sind Telomerase-positiv, ihre Telomerlänge wird jedoch nicht vollständig erhalten. Die Verkürzung der Telomere und die Seneszenz kann durch ektopische Expression der Telomerase, welche die Telomere stabilisieren oder sogar verlängern kann, verhindert werden. Für weitere Erläuterungen s. Text (modifiziert nach [23]).

### 1.3 Telomerase

Das Enzym Telomerase ist das Ribonukleoprotein mit einer reversen Transkriptase (RT)-Aktivität, welches Telomer-Wiederholungssequenzen an den Enden von linearen Chromosomen synthetisiert [7,102]. Die humane Telomerase besteht aus mindestens einer RNA-Untereinheit (hTR: *human telomerase RNA*), welche die Telomer-Synthese dirigiert, und einer Protein-Untereinheit (hTERT : *human telomerase reverse transcriptase*), welche die Telomer-Synthese katalysiert [103,104].

hTR wird von RNA-Polymerase II transkribiert und am 3'-Ende prozessiert. Das reife Transkript hat eine Länge von 451 Nukleotiden. Das Template, welches in der reversen Transkription eingesetzt wird, ist 11 Nukleotide lang und befindet in der Nähe des 5'-Endes (Nukleotide 46 bis 56) [6]. hTR ist in allen Zelltypen anwesend [6,105].

Die Sequenz von hTERT ist in den verschiedenen Organismen stark konserviert [9,10,11]. In der Vorstellung kann hTERT in drei Regionen unterteilt werden : in eine lange, in der Evolution konservierte N-terminale Verlängerung, eine zentrale katalytische RT-Domäne, die sieben in der Evolution konservierten RT-Motive enthält, und eine kurze C-terminale Verlängerung, welche innerhalb der verschiedenen Organismen schwach konserviert ist [106].

Eine der Eigenschaften des N-terminus von hTERT ist, dass er mehrere DAT-Domänen (*Dissociates Activities of Telomerase*) enthält [107,108]. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die DAT-Domänen an der „Rekrutierung“ der Telomerase zu den Telomeren und/oder der Regulation der Substrat-Erkennung und Verwertung beteiligt sind [107,108,109,110,111,112].

hTERT enthält RT-Motive, welche in anderen RT-Enzymen konserviert sind [10,11], sowie einige einzigartige Regionen, die zu den kennzeichnenden Merkmalen dieses Enzyms beitragen. Im Gegensatz zu anderen RT-Enzymen kopiert die Telomerase ein integriertes RNA-Template während der Katalyse [8].

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Telomerase ist das Hinzufügen von langen Reihen von Nukleotiden an einem gegebenen Primer trotz der geringen Länge der Templates. Besonders effizient in der Primer-Verlängerung sind die humane Telomerase und das Enzym der Ciliaten. Sie sind in der Lage Hunderte von Nukleotiden an den Ausgangsprimer hinzuzufügen, ohne zu dissoziieren [113,114]. Diese prozessiven Telomerasen müssen fähig sein, zwei Arten von Translokationsreaktionen durchzuführen : a) gleichzeitige Bewegung der RNA-DNA-Duplex

relativ zum aktiven Zentrum nach jedem Nukleotid-Einbau (Typ I oder *nucleotide addition processivity*), und b) Auflösen des RNA-DNA-Hybrids, gefolgt von einem Realignment des 3'-Endes der DNA relativ zum RNA-Template (Typ II oder *repeat addition processivity*) [115,116,117]. Die prozessive Synthese telomerer Wiederholungssequenzen ist eine weitere einzigartige Eigenschaft der Telomerase [7,113,114].

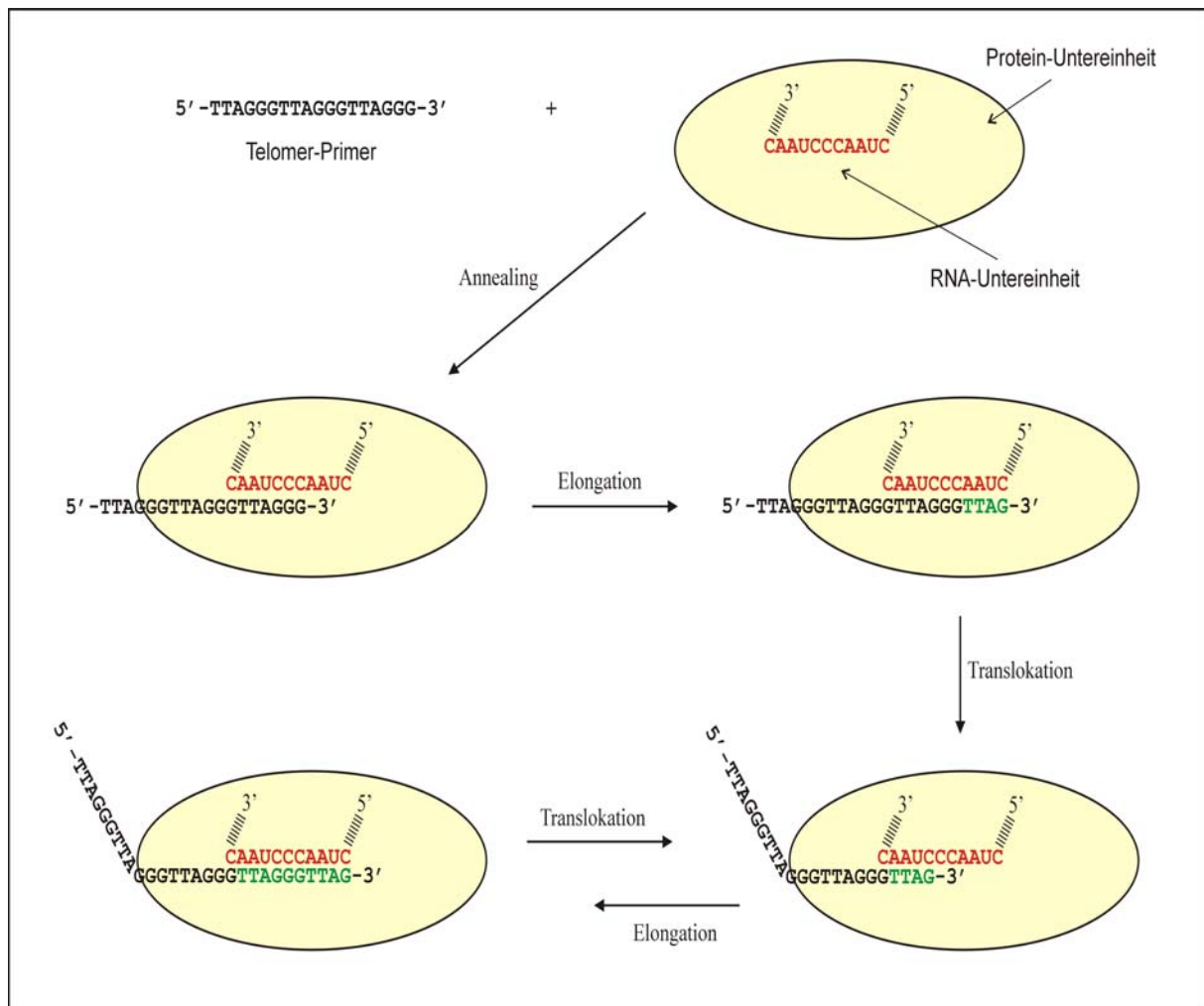
Es gibt eine Anzahl von Modellen, die diese Eigenschaft erklären können [118]. Während der Telomer-Elongation hybridisiert die Telomerase mit Hilfe ihres komplementären RNA-Templates mit dem Telomer-Ende, und hTERT katalysiert die De-novo-Addition von Telomer-DNA durch reverse Transkription. Anschließend transloziert das Enzym zu dem neusynthetisierten Chromosomen-Ende, wo das RNA-Template für eine weitere Runde der Telomer-Synthese neu ausgerichtet wird. In einem alternativen Modell transloziert die neusynthetisierte Telomer-DNA weg von dem Enzym, so dass das 3'-Ende der DNA relativ zum RNA-Template ausgerichtet werden kann. Dieses Modell lässt darauf schließen, dass ein Teil des Enzyms während der Translokation und des Realignments mit dem Telomer assoziiert bleibt. Eine plausible Erklärung dafür ist, dass eine *upstream* Region der Telomer-DNA eine stabile Interaktion mit einer *anchor site*-Domäne der Telomerase, welche unabhängig von der katalytischen Domäne ist, eingeht. Theoretisch würden diese Interaktionen die vollständige Enzym/DNA-Dissoziation während der Translokations- und Realignment-Ereignisse, die jede Runde der Telomer-Synthese begleiten, verhindern.

Studien mit Hefen-, Ciliaten- und humaner Telomerase beziehen mindestens zwei Telomerase-Bindungsstellen an der Telomer-DNA ein : eine am 3'-Ende und eine andere in einer G-reichen, 5'-Region. Es wird vorausgesetzt, dass das 3'-Ende des Telomer-Primers mit dem RNA-Template der Telomerase hybridisiert um die Telomer-Verlängerung zu initiieren, und die Interaktion der 5'-Region mit der *anchor site* der Telomerase der prozessiven Telomer-Elongation dient [119].

Den ersten direkten Nachweis für die Existenz einer Telomerase *anchor site* lieferte eine Studie mit dem Ciliaten *Euplotes aediculatus* [120]. Untersuchungen an Telomerase von *S.cerevisiae* und *Tetrahymena thermophila* deuten darauf hin, dass der TERT N-terminus eine evolutionär konservierte Telomer-DNA-Bindungsstelle enthält, welche die *anchor site* der Telomerase darstellen kann [121,122]. Wyatt et al. konnten zeigen, dass die ersten 350 Aminosäuren der hTERT eine kritische Rolle in der Regulation der Protein-DNA-

Interaktionen spielen. Hiermit wird die Hypothese, dass der TERT N-terminus die *anchor site* der Telomerase enthält, bestärkt. Ihre Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass eine zusätzliche Region innerhalb der RT-Domäne von hTERT an Protein-DNA-Interaktionen beteiligt ist. Es wird vermutet, dass der TERT N-Terminus, definiert durch Reste, die spezie-spezifische sowie evolutionär konservierte Merkmale haben, eine physische *anchor* Region enthält, die die Stärke und Spezifität der Protein-DNA-Interaktionen reguliert. Außerdem enthält die RT-Domäne eine evolutionär konservierte funktionelle *anchor* Region, welche für die katalytische Aktivität der Telomerase kritisch ist [123].

**Abb.3** zeigt eines der Modelle für den Mechanismus, welchen die Telomerase für die Telomer-DNA Synthese benutzt. Dieses Modell wurde zuerst von der Gruppe von E. Blackburn vorgeschlagen [124,125,126].



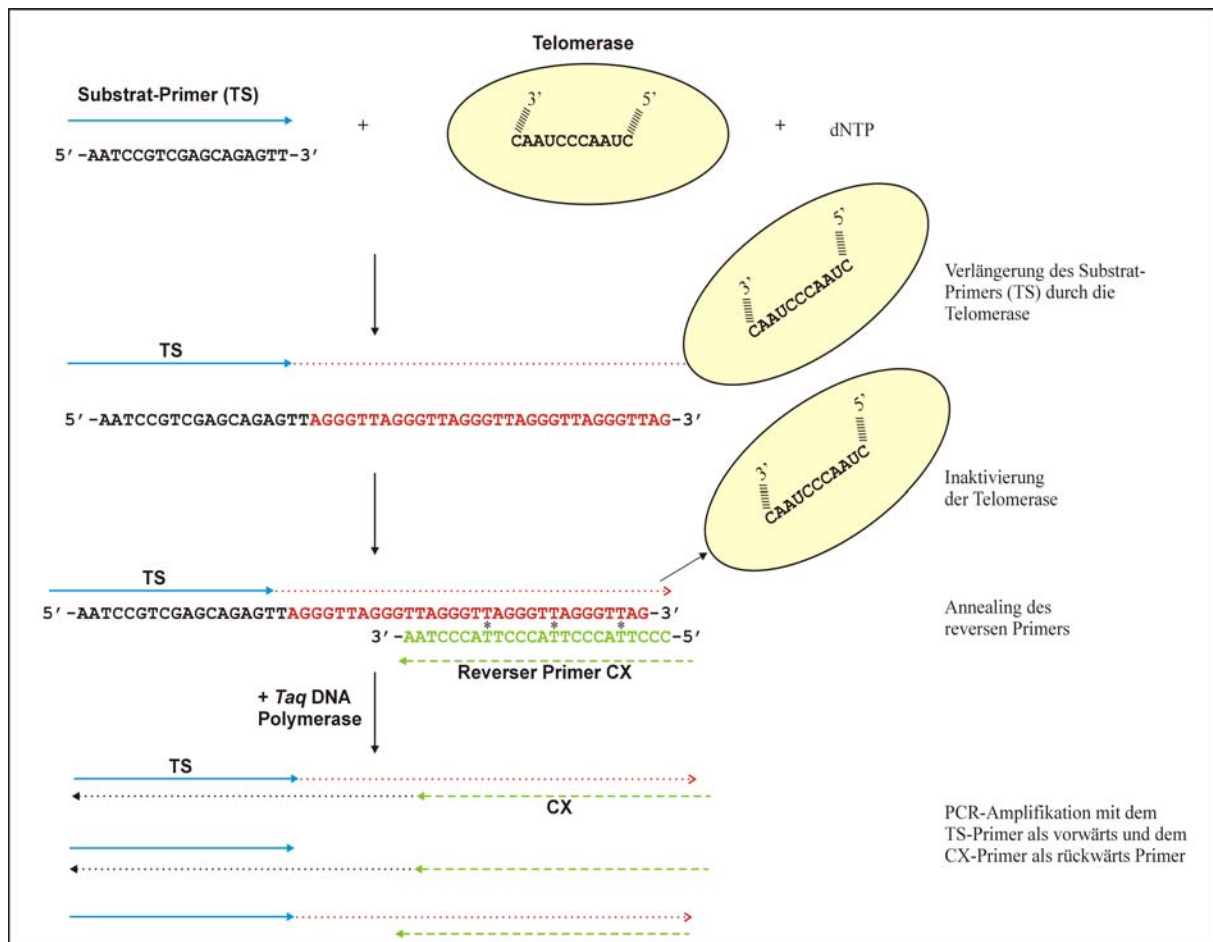
**Abb. 3:** Modell für den Mechanismus der Telomer-DNA Synthese von der Telomerase. Die Domäne der Telomerase RNA, welche als Template dient (in der Abbildung in rot dargestellt), bildet Basenpaare mit dem 3'-Ende der einzelsträngigen Telomer-DNA (TTAGGG beim Menschen). Indem die RNA als Template benutzt wird, kann der Telomer-Primer verlängert werden. Im ersten Schritt werden vier Telomer-Nukleotide (TTAG) angefügt. Im nächsten Schritt löst sich das verlängerte DNA-Ende von dem RNA-Template und das neugebildete 3'-Ende verändert seine Lage auf dem RNA-Template, jedoch ohne dass der Primer von dem Enzym dissoziiert. Auf diese Weise kann er erneut verlängert werden. Bei dieser Verlängerung werden sechs Nukleotide (GGTTAG) an das 3'-Ende der Telomer-DNA angefügt. Durch die effiziente Translokation, welche nach der Umschreibung der letzten 5'-RNA-Template Base in DNA eintritt, können Hunderte von Nukleotiden dem Ausgangsprimer angefügt werden, bevor eine Dissoziation eintritt (modifiziert nach [127]).

## 1.4 Nachweismethoden für die Telomerase

Ursprünglich wurde für die Bestimmung der Telomerase-Aktivität ein Oligonukleotid mit einer Telomer-Sequenz als Substrat für die Telomerase eingesetzt sowie ein Zellextrakt und ein Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP)-Mix. Die Aktivität konnte durch den Einbau von radioaktiven dNTPs oder eines am Ende radioaktiv-markierten Substrat-Oligonukleotids visualisiert werden [128,129,130]. Dieser direkte Assay war sehr nützlich um die Wirkungsweise der Telomerase sowie den Einfluss von verschiedenen Reaktionskomponenten zu charakterisieren, oder um die Enzym-Aktivität in vorher nicht-getesteten Organismen nachzuweisen [131,132,133,134,135]. Der Nachteil des direkten Assays ist, dass er eine sehr geringe Sensitivität hat, während relativ große Mengen an radioaktiv-markierte dNTPs benötigt werden. Aus diesem Grund ist diese Technik kaum für den Routinegebrauch geeignet [136].

Um die Empfindlichkeit, Effizienz und Geschwindigkeit des Telomerase-Aktivitäts-Nachweises zu erhöhen, wurde im Labor von Shay und Wright der TRAP-Assay (*Telomere Repeat Amplification Protocol*) entwickelt [13]. Da die Telomerase eine geringe Substrat-Spezifität besitzt, wurde das Substrat-Oligonukleotid, das eine Telomer-Sequenz besitzt, gegen einen Substrat-Primer (TS) mit nicht-telomerer Sequenz ausgetauscht. Auf diese Weise wurde es möglich die Produkte, die durch Verlängerung des Substrat-Oligonukleotids entstehen, spezifisch mittels einer PCR zu amplifizieren, während falsch-positive Amplifikationsprodukte, entstanden durch Amplifikation von genomischen Telomeren oder durch Kettenbildung von Primer-Dimeren, unterdrückt wurden. In **Abb.4** ist der TRAP-Assay schematisch dargestellt.





**Abb. 4:** Schematische Darstellung des TRAP-Assays. Die Telomerase fügt zuerst an den Substrat-Primer (TS), der eine nicht-telomere Sequenz besitzt, Telomere-Wiederholungssequenzen (in rot dargestellt) an. Diese primären Telomerase-Produkte werden mittels einer PCR spezifisch amplifiziert. Als vorwärts Primer wird der TS-Primer, und als rückwärts-Primer der CX-Primer eingesetzt. \* kennzeichnen Nichtübereinstimmungen im CX-Primer, welche eingefügt wurden, um die Entstehung von Primer-Dimeren zu reduzieren. *Taq* DNA Polymerase und CX-Primer können vom Rest des Reaktionsmixes durch eine Wachbarriere getrennt oder während der Hitze-Inaktivierung der Telomerase zugegeben werden. Wenn eine Hot-Start DNA Polymerase in der PCR eingesetzt wird, können alle Komponenten in dem anfänglichen Mix vorhanden sein. Die Hot-Start DNA Polymerase wird dann während der Inaktivierung der Telomerase aktiviert (modifiziert nach [136]).

Das Muster der TRAP-Reaktionsprodukte ist in der Regel eine Leiter aus Banden, mit einer Periodizität, die der Größe der telomeren Wiederholungssequenz (bei Vertebraten 6 Bp) entspricht. Die Unterschiede in der Produktlänge kommen nicht nur von der natürlichen Verteilung der Anzahl der Elongationsschritte, die die Telomerase an unterschiedlichen TS-Primer Molekülen macht, sondern auch von den alternativen Annealing-Positionen, an denen der CX-Primer im primären Telomerase-Produkt binden kann. Deshalb muss die

Endverteilung der TRAP-Produkte nicht die ursprüngliche Länge der primären Produkte widerspiegeln. Um dieses Problem zu lösen wurde der TRAP-Assay modifiziert. Der CX-Primer wurde am 5'-Ende durch drei Nukleotide (GTG) verlängert, um sein Annealing an den Enden von Molekülen, die in den ersten Zyklen der PCR generiert werden, besser zu definieren. Mit dieser Modifikation kann die maximale Größe der originalen Telomerase-Produkte bestimmt werden. Außerdem wurden die falsch-positiven Ergebnisse, die aufgrund von PCR-Artefakten entstehen können, im wesentlichen eliminiert [137].

Um eine semiquantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde ein interner Standard (IS) mit TS- und CX-homologen Enden eingeführt. Der IS, der in attomolaren oder subattomolaren Konzentrationen zugegeben wird, konkurriert mit den Telomerase-Produkten um dieselben Primer, und auf diese Weise wird der lineare Bereich des TRAP-Assays bestimmbar. Die Amplifikation des IS ist wichtig, um falsch-negative Proben, die Inhibitoren der *Taq* DNA Polymerase enthalten, auszuschließen [138].

In der ursprünglich beschriebenen Technik wurden die Produkte radioaktiv markiert. Der Nachweis der Produkte und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gefolgt von Autoradiographie. Es wurde jedoch gezeigt, dass die optimierte Reaktion empfindlich genug ist, um Fluoreszein-markierte Substrat-Primer [139] einzusetzen oder die Produkte nach der elektrophoretischen Trennung z.B. mit SYBR-Green anzufärben [140,141].

Verschiedene andere Modifikationen wurden seit der Einführung des TRAP-Assays vorgeschlagen, hauptsächlich um die zeitaufwendigen und arbeitsintensiven post-PCR Schritte, nämlich die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), zu vereinfachen und die Quantifizierung zu verbessern. In **Tabelle 1** ist ein Vergleich des TRAP-Assays mit den unterschiedlichen Modifikationen dieses Assays, sowie mit den alternativen Assays gegeben [136].

In **Tabelle 1** wird der TRAP-Assay mit seinen unterschiedlichen Modifikationen sowie alternativen Assays verglichen.

Assay	Sensitivität [Zellen]	Vorteile im Vergleich zum klassischen TRAP	Zusätzliche Voraussetzungen und Nachteile im Vergleich zum klassischen TRAP	Ref.
TRAP	100	—	—	[13,138]
Direktes Assay	$\cong 10^6$	Das Sequenziergel gibt Informationen über die Telomerase-Produkte (Menge, Produktleiter usw.)	Aufwendig, hoch-radioaktiv, lange Exponierungszeiten	[113,130]
TRAP mit fluoreszenten Primern (F-TRAP)	100	Nicht-radioaktiv	Benötigt Fluorescein-markierte Primer	[139]
TRAP mit Fluoreszenz- Färbung der Produkte	50	Nicht-radioaktiv	—	[142]
TRAP-SPA	10	PAGE nicht notwendig, hoher Durchsatz dank Mikrotiterplattenformat, leicht quantifizierbar	Benötigt [ $^3\text{H}$ ]-TTP und biotinylierten Primer	[143]
TRAP/HPA	10	PAGE nicht notwendig, Mikrotiterplattenformat, leicht quantifizierbar, keine Radioaktivität	Benötigt AE-markierte Sonde	[144]
TRAP mit Amplifluor Primer (TRAPeXL)	50-100	PAGE nicht notwendig, hoher Durchsatz, schnelle und leichte nicht-radioaktive Quantifizierung, unterschiedliche Markierung des Produkts und der Kontrolle, als kommerzielles Kit vorhanden	Preis des Kits	[145]
TRAP-ELISA	10	Nicht-radioaktive chromogene Detektion ohne PAGE, als kommerzielles Kit vorhanden	Indirekter Nachweis, Preis des Kits	[146,147]
Real-Time TRAP, welcher TRAPeXL nutzt	50	Wie bei TRAPeXL, zusätzlich direkte Erkennung der falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse, exakte Quantifizierung	Benötigt Real-Time-PCR Gerät, Preis des Kits	[148,149]
<i>In situ</i> TRAP	$\cong 1$	Information über die Telomerase-Aktivität in intrazellulärer und morphologischer Hinsicht	Aufwendige Prozedur, niedriger Durchsatz, benötigt Fluoreszenzmikroskop	[150]
TMA/HPA	$\cong 1$	Isotherme Amplifikation, Beseitigung der PCR- Artefakte, Detektion ohne PAGE, hoher Durchsatz	Benötigt AE-markierte Sonde	[151]
ELIPA	5	Lineare Dosis-Wirkung, welche in direkter Beziehung mit dem Telomerase-Produkt steht, Beseitigung der PCR-Artefakte und der PAGE, hoher Durchsatz, nicht-radioaktiv	Benötigt Luziferase- Biolumineszenz Nachweissystem und Luminometer	[152]
Optischer Biosensor	$\cong 10^5$	Nicht-radioaktive Detektion, Beseitigung der PCR- Artefakte und der PAGE	Benötigt Phosphorothioat- modifiziertes Oligonukleotid und Fiber-Optik Gerät	[153,154]
TRE	$\cong 100$	Beseitigung der PCR-Artefakte und der PAGE, hohe Reproduzierbarkeit, keine Interferenz bei bis zu 1000-fachem Überschuss an negativen Hintergrund- Zellen, Information über die Reaktionskinetik	Benötigt BIACORE Gerät und biotinylierten Primer	[155]

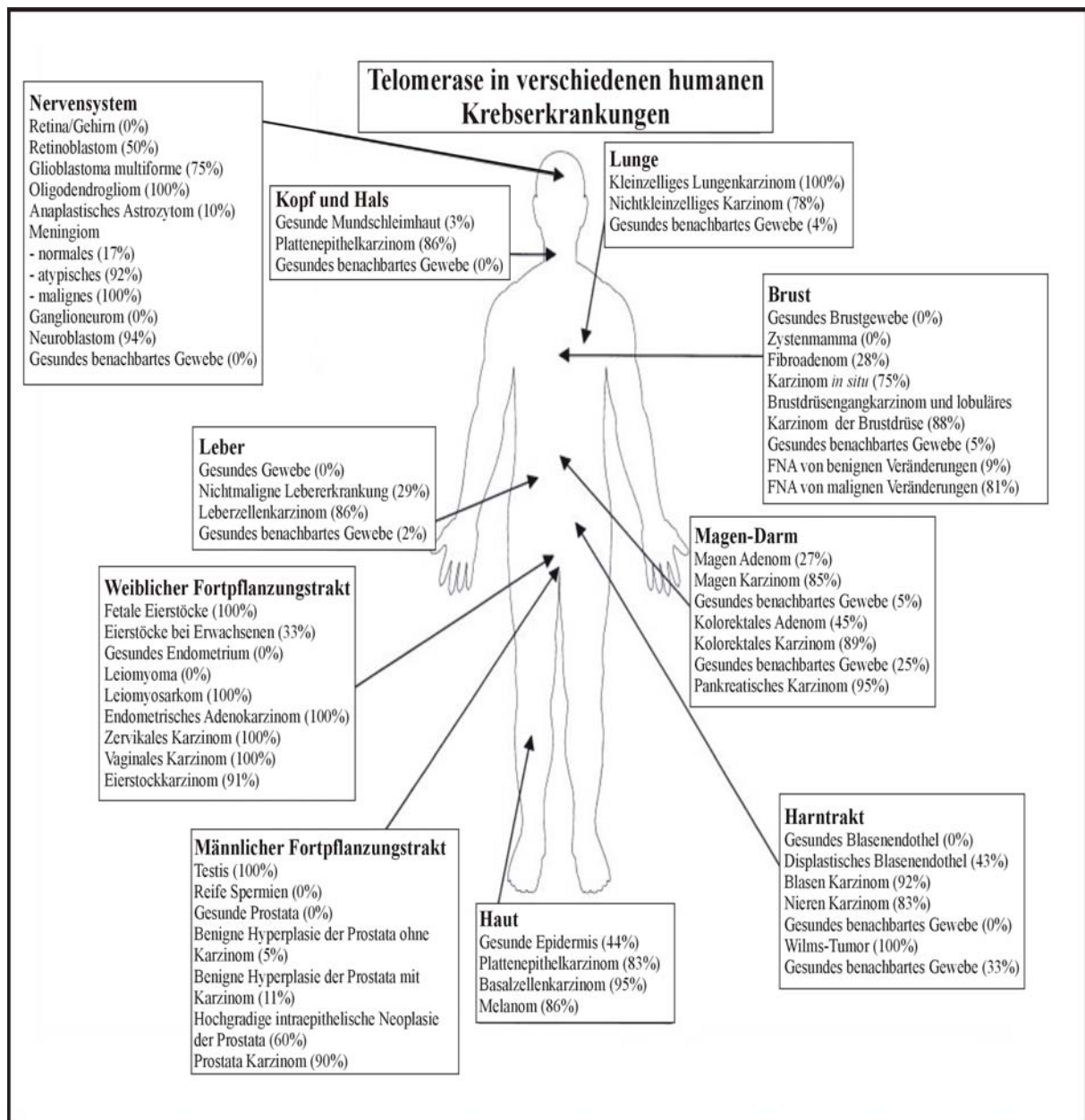
**Tabelle 1:** Vergleich des TRAP-Assays mit den unterschiedlichen Modifikationen dieses Assays, sowie mit den alternativen Assays. Die Sensitivität ist als Mindestanzahl Telomerase-positiver humaner Tumorzellen pro Assay definiert. Abkürzungen: **Ref.** : Referenzen, **SPA** : *scintillation-proximity assay*, **HPA** : *hybridization protection assay*, **ELISA** : Enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung, **TMA/HPA** : *transcription-mediated amplification and hybridization protection assay*, **AE** : Acridiniumester, **ELIPA** : *enzymatic luminometric pyrophosphate assay*, **TRE** : *telomeric repeat elongation* (modifiziert nach [136]).

## 1.5 Telomerase und Krebs

Normale humane somatische Zellen besitzen niedrige bis nicht-nachweisbare Level an Telomerase-Aktivität, welche ungenügend sind, um die Telomerlänge zu erhalten. Dagegen zeigen über 90 % der getesteten humanen Tumor-Zellpopulationen, hohe Levels an Telomerase-Aktivität und können ihre Telomerlänge erhalten [12,156]. Normale humane Telomerase-positive Zelltypen sind stimulierte Lymphozyten [157,158,159], das Darmepithel [160], das Speiseröhren-Epithel [161], das periodische Endometrium [162,163,164], basale Keratinozyten [165,166], das zervikale Epithel [166], blutbildende Stammzellen [167] sowie die Keimzellen in Ovarien und Testis [13].

In **Abb. 4** ist eine umfassende Zusammenstellung der Telomerase in humanen Tumoren dargestellt. Die Telomerase-Aktivität wurde mit sehr wenigen Ausnahmen mit Hilfe des TRAP-Assays gemessen. Mit ihm können schon 0,01% positive Zellen erfasst werden. Das Hintergrund-Gewebe ist in den meisten Fällen „normaler“ somatischer Herkunft und trägt nicht zur Telomerase-Aktivität bei. Jedoch in Fällen, in denen das histologische Umfeld des Tumors natürlich Telomerase exprimiert, wird ein positives Ergebnis nur dann berücksichtigt, wenn der Telomerase Level höher ist als der des entsprechenden Kontrollgewebes [12].

Die hematopoietischen Tumoren sind schwer einzuschätzen, da aktivierte Lymphozyten Telomerase-Aktivität besitzen [168].



**Abb. 5:** Übersicht der Expression der Telomerase-Aktivität in humanen Krebserkrankungen. Die Prozentzahl in Klammern bezieht sich auf die Zahl der Telomerase-positiven Proben im Vergleich zu dem entsprechenden Kontrollgewebe. Abkürzungen: FNA : Feinnadelpunktion (modifiziert nach [169]).

## 1.6 Telomerase als diagnostischer und prognostischer Marker

Indem man den Unterschied in der Telomerase-Expression normaler und Tumorzellen nutzt, kann die Detektion der Telomerase-Aktivität oder Telomerase-Komponenten als ein potentieller neuer diagnostischer Marker für ein breites Spektrum an Krebsarten nützlich sein (Übersicht bei [18,170]). In manchen Fällen, wenn die Telomerase-Aktivität in den meisten Tumorzellen im präneoplastischen oder im *in situ*-Stadium auftritt, kann sie für die Früherkennung von Krebs, besonders in zytologischen Proben, geeignet sein. In anderen Fällen, in denen die Level der Telomerase-Aktivität nicht hoch sind, jedoch mit Fortschreiten der Krebserkrankung steigen [12], können die Telomerase-Aktivitäts-Levels im Tumor-Gewebe als prognostische Indikatoren für den Krankheitsausgang der Patienten dienen [171]. Die Telomerase-Aktivität ist auch ein nützlicher Indikator bei der Bestimmung des Malignitätsgrades in der Gruppe der Tumoren, bei denen es vorkommt, dass zwischen benignen und malignen Tumoren mit morphologischen Untersuchungen nicht unterschieden werden kann. Zu dieser Gruppe gehören Gehirn-Tumoren [172,173], follikuläre Adenokarzinome der Schilddrüse [174], pankreatische endokrine Tumoren [175], Harnwegsepithel-Zellkarzinome [176] und zervikale intraepitheliale Neoplasien (Geschwulstbildungen). Bei diesen Tumoren wurde eine Korrelation der Telomerase-Aktivitäts-Levels mit der Prognose der Patienten beobachtet [177].

Im Neuroblastom, einem der häufigsten Tumoren im Kindesalter, korrelierte hohe Telomerase-Aktivität mit einem schlechten Krankheitsausgang, während bei geringer Aktivität der Krankheitsausgang gut war [178,179,180,181]. Typischerweise wurde bei manchen Stadium-IVS Neuroblastomen, welche sich später rückbildeten, keine Telomerase-Aktivität und verkürzte Telomere beobachtet [178,179]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Telomerase-Aktivität ein nützlicher Marker für die Vorhersage des Krankheitsausgangs und für die Bestimmung einer angemessenen Behandlung von Patienten mit solchen Tumoren ist [171].

In der Gruppe der Tumoren, zu der Krebsarten wie das nichtkleinzellige Lungenkarzinom, Magenkrebs und das Neuroblastom gehören, wird die Telomerase-Aktivität während des Fortschreitens der Krankheit hochreguliert. Hier ist die Telomerase nicht nur für die Bewertung des Malignitätsgrades nützlich, sondern sie korreliert auch mit der Prognose der Patienten. Die Levels der Telomerase-Aktivität scheinen in den meisten Adenokarzinomen,

die vom Magen und Dickdarm abstammen, mit fortgeschrittenem Stadium der Krebsprogression zuzunehmen [182,183,184,185], und die Anwesenheit von Telomerase-Aktivität korrelierte mit schlechter Prognose der Magenkrebs-Patienten [182]. Im Stadium I des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms wurde auch eine Korrelation der Levels der Telomerase-Aktivität mit der Prognose der Patienten beobachtet [186]. In einer rückblickenden Studie mit einer großen Anzahl von Brustkrebs-Proben korrelierte die Telomerase-Aktivität mit mehreren ungünstigen prognostischen Faktoren. Höhere Aktivitäts-Level waren auch mit einem schlechteren klinischen Ergebnis verbunden [187].

Erhöhte Levels der Telomerase-Aktivität sind ein prognostischer Indikator für einen schlechten Krankheitsausgang bei Patienten mit Kolorektalkrebs, unabhängig von dem Stadium der Krankheit und der Klassifikation nach Dukes. Bei Tumoren in frühen Stadien könnte die Selektion der Patienten für eine zusätzliche Chemotherapie auf Basis von hohen Telomerase-Aktivitäts-Levels eine effektive Methode sein, um die Prognose dieser Patienten zu verbessern. Ferner könnte das Ausschließen von Patienten mit geringem Risiko von einer postoperativen Chemotherapie ernsthafte Nebeneffekte verhindern [185].

## **1.7 Telomerase-Inhibitoren**

Die Telomerase könnte nicht nur ein leistungsstarker Marker für die Krebsdiagnose und Prognose sein, sondern auch ein rationales Target für die Anti-Krebs-Therapie (Review bei [188]). Mehrere potentielle chemotherapeutische Strategien, die auf der Telomer- und Telomerase-Biologie basieren, sind in Entwicklung. Hierzu gehören Wirkstoffe, deren direkte Targets die Telomerase und die Telomere oder die Telomerase-assoziierten Regulationsmechanismen sind, sowie Strategien wie die Telomerase-Immunotherapie und die Telomerase-vermittelte Tumor-spezifische Gentherapie, deren Targets Telomerase-positive Zellen sind. Die Telomer-DNA und die beiden Kernkomponenten der Telomerase (hTERT und hTR) werden für die Funktion der Telomerase eindeutig benötigt und eignen sich deshalb gut für eine Anti-Telomerase-Strategie [23].

Im folgenden werden einige der Wirkstoffe, die gegen die hTR gerichtet sind, vorgestellt.

Die 11 Basen der Template-Region der hTR sollten ein sehr gutes Target für eine direkte Hemmung der Telomerase-Aktivität sein [189]. Ungeachtet der Konformation des

Telomerase-Holoenzym muss die Template-Region zugänglich sein, um die telomere Wiederholungssequenz binden zu können. Deshalb sollten gegen die Template-Region der hTR gerichtete Oligonukleotide ihr Ziel erreichen können. Die größte Herausforderung für diese Gruppe von Wirkstoffen ist der Zugang und die Stabilität, d.h. wie schleust man das Oligonukleotid in die Zelle ein, und transportiert es dann zum Enzym, ohne dass es von Nukleasen abgebaut wird [190].

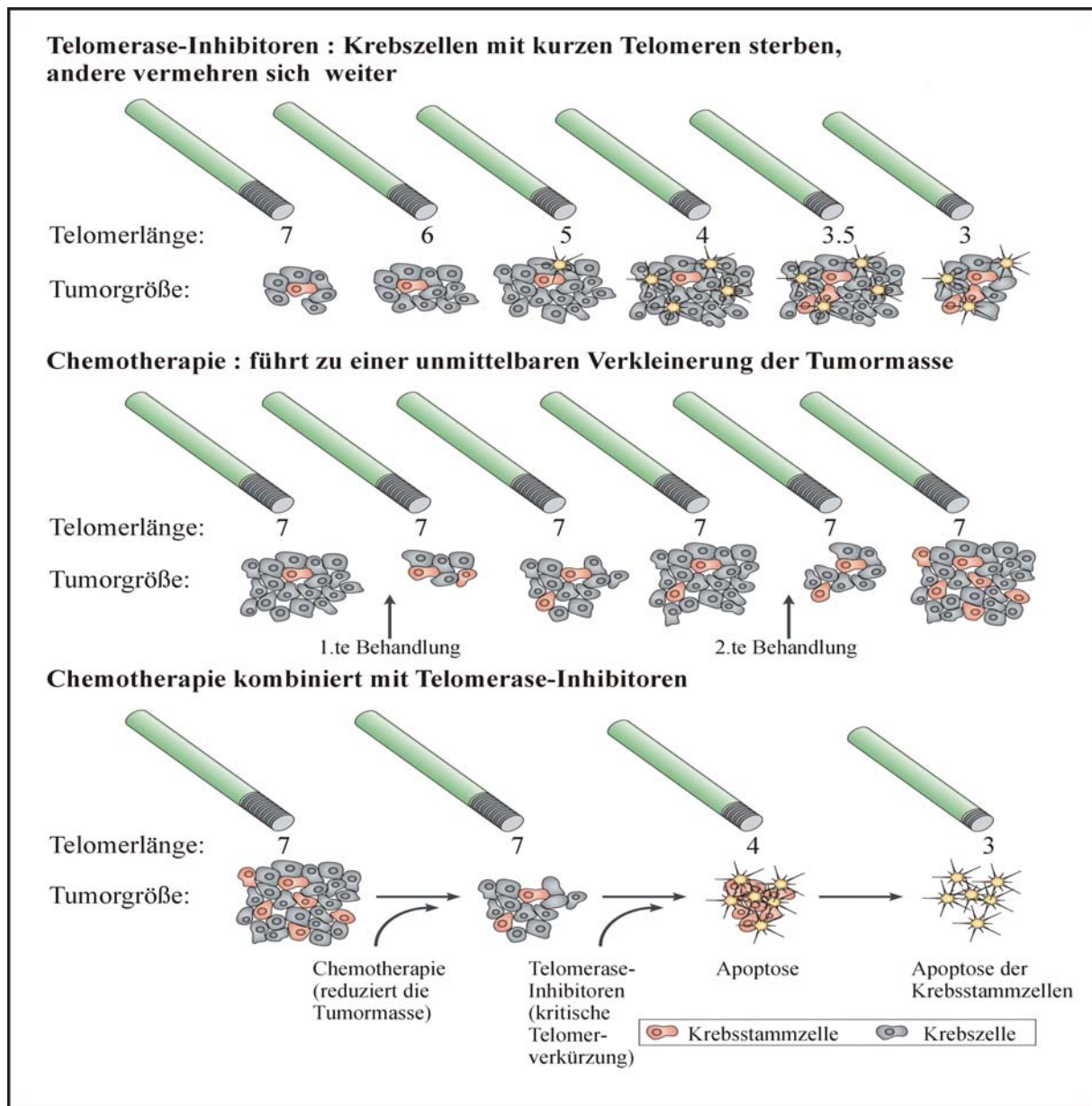
Da die klassischen Phosphodiester-DNA-Oligonukleotide nachteilige chemische Eigenschaften besitzen, wurden chemisch-veränderte Oligonukleotide entwickelt. Bei den Modifikationen handelt es sich meistens um eine veränderte Rückgrat-Struktur der Moleküle. Ziel ist dabei die Verbesserung von Hemmungsparametern, Stabilität, Aufnahme und subzellulärer Zuführung. Es wurden Versuche mit partiell- und vollständig-Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden [191], Peptidnukleinsäuren (PNA) [16,192], 2'-O-Alkyl-RNA [16,193], N3' → P5' Phosphoramidaten oder Thio-Phosphoramidaten [194,195] durchgeführt. Eine besondere Gruppe Telomerase-Inhibitoren stellen die chimären Oligonukleotide, welche sehr gute Telomerase Inhibitoren sind, dar. Sie bestehen aus einer 4-Thiouridylat-modifizierten [196] bzw. Phosphorothioat-modifizierten [197] Hälfte, die mit einer antisense Hälfte erweitert ist. Die antisense Hälfte besteht aus 11 unmodifizierten oder modifizierten Basen, die komplementär zu den 11 Basen der Template-Region sind [197], oder aus 13 unmodifizierten DNA-Basen, komplementär zu der Template-Region und zusätzlich zu je einer Base *up-* und *downstream* [196]. Es wird angenommen, dass die antisense Hälfte eine Doppelhelix mit der hTR bildet, während der restliche Teil des Inhibitor-Moleküls mit der Protein-Untereinheit interagiert [196,197].

Es werden auch antisense Moleküle eingesetzt, die nicht gegen die Template-Region gerichtet sind. Die effektivsten Inhibitoren unter ihnen sind diese, deren Targets Sequenzen der hTR sind, welche maßgebliche Beiträge für das Holoenzym-Komplex *assembly* leisten [23].

Ribozyme, die gegen die hTR gerichtet sind, können Telomerverkürzung und Apoptose in bestimmten *in vitro* Zellkulturen induzieren [198].

In **Abb. 6** ist ein Vergleich zwischen der üblichen Chemotherapie und einer Anti-Telomerase-Therapie gezeigt, sowie das mögliche Ergebnis einer kombinierten Therapie.





**Abb. 6:** Prognostizierte Ergebnisse der Anti-Telomerase-Therapie : a) Die meisten, jedoch nicht unbedingt alle Anti-Telomerase-Therapien würden eine Zeitperiode benötigen, in der bereits kurze Telomere in einen Zustand der *crisis* und des apoptotischen Zelltodes getrieben werden. Während dieser Behandlungszeit würden sich die Telomere allmählich verkürzen, die Tumormasse würde jedoch fortfahren sich zu vergrößern. Ein Telomerase-Inhibitor allein könnte nicht effektiv sein, da der Zelltod nur nach vielen Zellteilungen eintreten würde. b) Chemotherapeutische Behandlung der Krebszellen reduziert die Tumorgroße, beeinträchtigt jedoch nicht die Telomerlänge. Deshalb teilen sich residuale Tumorzellen weiter und können eine Resistenz zur Therapie entwickeln c) Das Verbinden der Chemotherapie mit der Telomerase-Therapie würde zu einer Verkürzung der Telomere führen und die Tumormasse verringern. Selbst wenn seltene Krebsstammzellen ruhend sein sollten, müssten sie schließlich proliferieren, um das Tumorwachstum zu erhalten. Die Anwesenheit einer nicht-toxischen oder minimal-toxischen Dosis von einem Telomerase-Inhibitor sollte die Telomerase-positiven Krebsstammzellen beeinflussen und schließlich zur Apoptose führen (modifiziert nach [190]).

Ein wesentlicher, unerwünschter Effekt einer Telomerase-Hemmungstherapie ist deren Einfluss auf die Telomerase-positiven Fortpflanzungszellen und anderen proliferativen Zellen der Erneuerungsgewebe [199,200,201,202,203]. Zellen aus solchen Geweben haben normalerweise viel längere Telomere als die meisten Tumorzellpopulationen. Außerdem sollten die Stammzellen der Erneuerungsgewebe viel weniger beeinflusst werden als die sich teilenden Tumorzellen, denn sie proliferieren nur gelegentlich und die Telomerverkürzung sollte nicht in Abwesenheit von Zellteilung eintreten. Da sich die meisten primitiven Stammzellpopulationen nur selten teilen, sollten sich ihre Telomere viel langsamer als die Telomerase-gehemmter, proliferierender Krebszellen verkürzen. Nachdem sich die Telomere der Krebszellen verkürzt haben und sie gestorben sind, könnte die Anti-Telomerase-Therapie eingestellt werden, und die Telomerase-Aktivität in den Fortpflanzungs- und Stammzellen würde wiederhergestellt werden. Auf diese Weise würde die Anti-Telomerase-Therapie wahrscheinlich das proliferative Potential der Krebszellen beseitigen, bevor die Telomerlänge in den normalen Fortpflanzungs- und Stammzellen ausreichend kurz wäre, um ihre Funktion zu stören [204].

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Doktorarbeit sollte ein neuer sensitiver Assay zum Nachweis der humanen Telomerase entwickelt werden. In diesem Assay sollten die beiden Kernkomponenten der Telomerase, nämlich die Protein-Untereinheit (hTERT) und die fest mit ihr verknüpfte RNA (hTR), die Targets sein. Im ersten Schritt des Assays sollte die Telomerase aus einer Telomerase-haltigen Probe an der hTERT gebunden werden. Im nächsten Schritt sollte die hTR aus dem Telomerase-Molekül nachgewiesen werden. Da diese beiden Komponenten ausreichen, um die Aktivität der Telomerase zu rekonstruieren [104], sollte dieser Nachweis einer Aktivitätsdetektion äquivalent sein.

Zur Immobilisierung der Telomerase sollte eine Heparin-beschichtete oder eine mit Phosphorothioat-modifizierten (PS) Oligonukleotiden -beschichtete Festphase eingesetzt werden.

Heparine sowie PS-Oligonukleotide sind Inhibitoren der humanen Telomerase. Es wird angenommen, dass PS-Oligonukleotide die Telomerase an der *anchor site*, und Heparine an

eine Bindungsstelle, welche von der *anchor site* verschieden ist, binden [197]. PS-Oligonukleotide inhibieren die Telomerase in einer Sequenz-unabhängigen, jedoch längenabhängigen Weise [205]. In diesem ersten Schritt des Assays werden zusammen mit der Telomerase die Heparin-bindenden Proteine [19] an der Festphase immobilisiert.

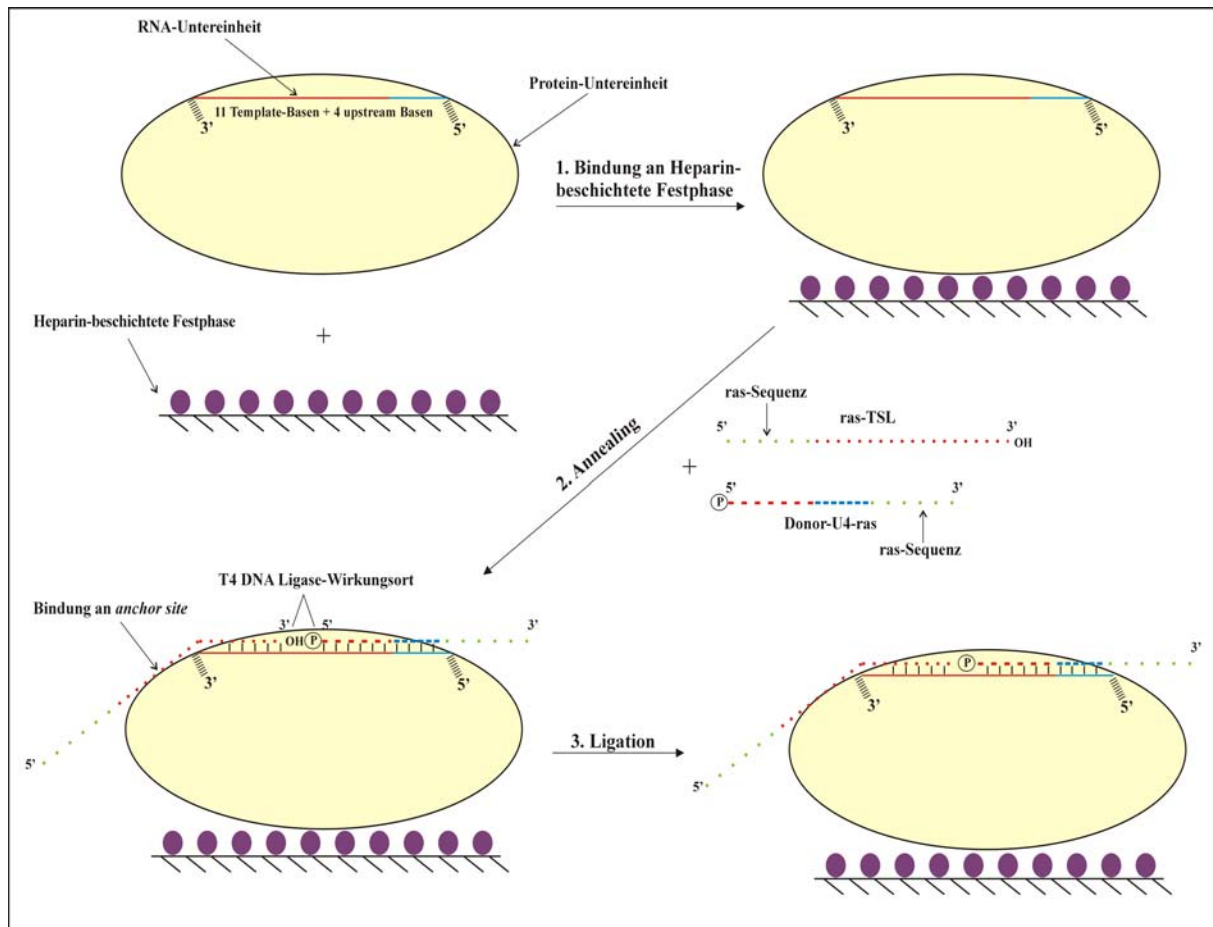
Im zweiten Schritt des Assays sollte spezifisch die hTR detektiert werden.

Um die hTR direkt nachzuweisen, sollte ein Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) etabliert werden. Da Heparine die Telomerase nicht an der *anchor site* hemmen, würde diese nach der Immobilisierung der Telomerase an eine Heparin-beschichtete Festphase zur Verfügung stehen. Die 11 Template-Basen der hTR sind zugänglich, sowie vier weitere, welche sich *upstream* von dem Template befinden. Auf die Zugänglichkeit der vier Basen deutet das Ergebnis, dass ein PNA (T9/U4/PNA), welches komplementär zu 9 Template-Basen und 4 benachbarten *upstream* Basen ist, die Telomerase gut hemmt [205,206]. Deshalb sollten diese 15 Basen als Template in dem OLA benutzt werden. Zu der immobilisierten Telomerase sollten zwei Oligonukleotide zugegeben werden : der Donor und der Akzeptor der Ligationsreaktion. Der Akzeptor (ras-TSL) trägt die 3'-OH-Gruppe und sollte mit seinem 5'-Ende an die *anchor site* binden, während er 3'-terminal komplementär zum Template sein sollte. Der in 1.4 beschriebene TS-Primer besitzt diese Eigenschaften. Er bindet 5'-terminal die *anchor site* und ist 3'-terminal komplementär zu 3 Basen des Templates. Um die Bindung zum Template zu verstärken, sollte er 3'-terminal um 2 weitere Basen verlängert werden. Der Donor (Donor-U4-ras) steuert die 5'-Phosphat-Gruppe bei. Er ist komplementär zu den restlichen 6 Basen des Templates und zu den benachbarten 4 *upstream* Basen. Donor sowie Akzeptor sind an ihren 5'- bzw. 3'-Ende mit einer ras-Sequenz verlängert. Falls das Ligationsprodukt nicht direkt nachweisbar sein sollte, soll diese Sequenz eine Signal-Amplifikation mit Hilfe einer ras-PCR ermöglichen.

Um den Akzeptor und Donor miteinander zu ligieren wird T4 DNA Ligase eingesetzt. Diese Ligase ist in der Lage, das RNA:DNA-Hybrid mit einem Einzelstrangbruch in der DNA, welches das Template und die beiden Ligationspartner bilden, zu ligieren [207].

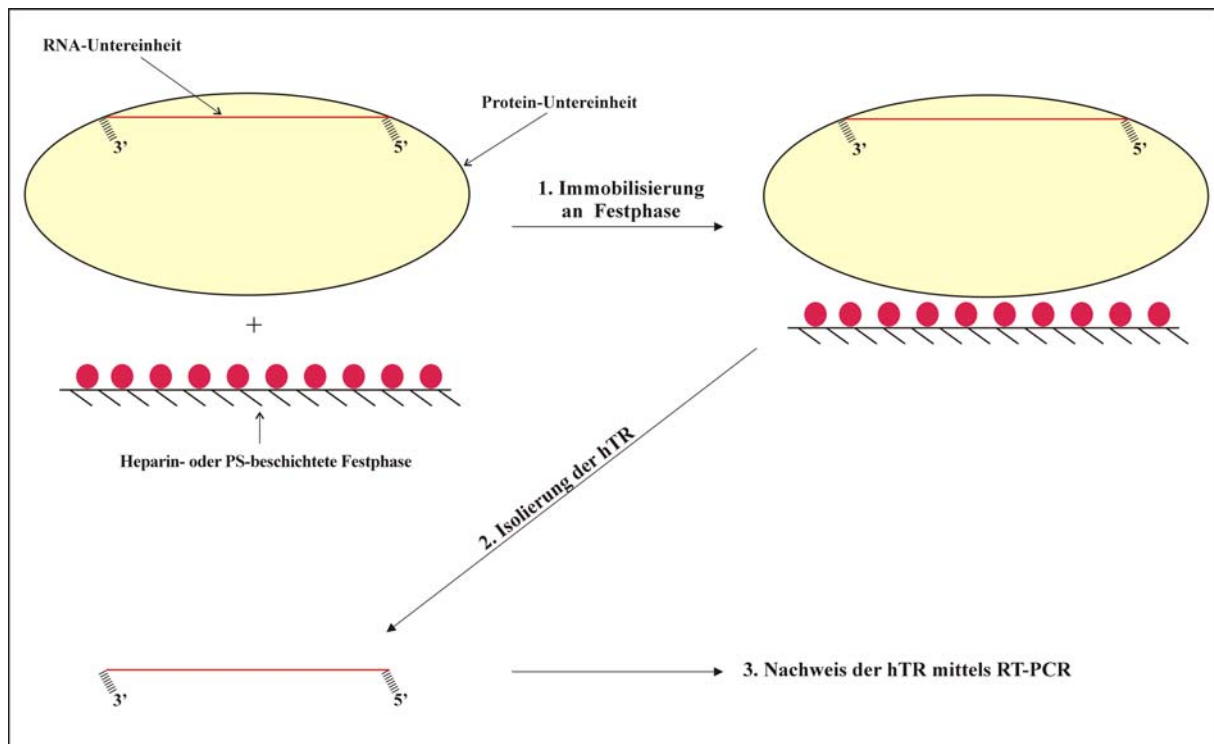
Bei dieser Strategie darf keine hTR, welche nicht aus dem Telomerase-Molekül stammt, an die *Beads* gebunden werden, um keine falsch-positiven Signale zu generieren.

In **Abb. 7** ist die Strategie für den Nachweis der humanen Telomerase mittels OLA nach Bindung an die Festphase mit Hilfe von Heparin schematisch dargestellt.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Strategie zum Nachweis der humanen Telomerase mittels Immobilisierung durch Heparin und Nachweis der hTR durch OLA. Die 11 Template-Basen sind in rot, die 4 benachbarten *upstream* Basen in blau abgebildet.

Als alternative Methode zur Detektion der hTR war eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) geplant. Hierzu sollte von der Festphase mit der gebundenen Telomerase RNA isoliert werden, um dann die hTR mit einer RT-PCR nachzuweisen. Da hier die *anchor site* nicht benötigt wird, könnte die Immobilisierung an die Festphase mit Heparin oder PS-Oligonukleotiden erfolgen. Auch bei dieser Strategie muss eine Bindung der hTR, welche mit der hTERT-Untereinheit nicht fest verknüpft ist, sowie von genomischer DNA an die *Beads* verhindert werden. Da das hTR-Gen keine Introns enthält [208,209], würde genomische DNA bzw. die nicht-Telomerase-gebundene hTR ein Template für die RT-PCR darstellen, und zu einem falsch-positiven Signal führen. In **Abb. 8** ist diese Strategie schematisch dargestellt.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der Strategie zum Nachweis der humanen Telomerase mittels Immobilisierung durch PS-Oligonukleotide oder Heparin und Nachweis der hTR durch Reverse-Transkriptase-PCR

Das Ziel war, einen Assay zu entwickeln, dessen Empfindlichkeit in dem Bereich des TRAP-Assays liegt, jedoch die Nachteile des TRAPs, wie falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse, nicht besitzt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- **Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)** : Hettich Universal 30 RF Zentrifuge mit Rotor 1424 A (max. 5000 rpm)
- **ASYS Hitech GmbH (Eugendorf, Österreich)** : Anthos Labtec HT2 Photometer
- **BANDELIN GmbH & Co. KG (Berlin)** : Sonopuls HD 2070 Ultraschall Homogenisator
- **BDK GmbH (Sonnenbühl-Genkingen)** : Sterilbank
- **Beckman Coulter, Inc., Fullerton CA, USA** : Optima™ TLX Ultrazentrifuge mit Rotor TLA-120.1
- **Biometra GmbH (Göttingen)** : *Mini Rocking Platform* (Taumler), TRIO-Thermoblock
- **Bio-Rad-Laboratories GmbH (München)** : Mini Trans-Blot® Elektrophoretische Transferzelle, Spannungsquelle PowerPac 3000, BioLogic Chromatography System
- **Carestream Molecular Imaging Inc. (New Haven CT, USA)** : KODAK ImageStation 440<sub>CF</sub>
- **Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena)** : Inverses Mikroskop
- **Eppendorf AG (Hamburg)** : Thermomixer 5436, *miniSpin* Zentrifuge, Zentrifuge 5402 mit Rotor F-15-18-11
- **Heidolph Elektro GmbH (Kelheim)** : Magnetrührer Typ MR 1000 / MR 3002
- **Helmut Hund GmbH & Co. KG (Wetzlar)** : Inverses Mikroskop Wilovert S
- **Heraeus (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL, USA)** : Inkubator B15, Brutschrank HBBD 6220, Sterilbank LaminAir HB2448
- **Hoefer, Inc. (San Francisco CA, USA)** : Hoefer SE 400 vertikale Elektrophoreseanlage
- **IKA®Werke GmbH & Co. KG (Staufen)** : Vortexer VF2
- **MJ Research (Bio-Rad-Laboratories GmbH, München)** : Gradient Cycler PTC-200
- **PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)** : PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S
- **Sartorius AG, (Göttingen)** : Waage BP 610, Analysenwaage Research R160P

- **Snijders Hammerlit b.v. (Tilburg, Niederlande)** : Drehrad (*test-tube-rotator* 34528)
- **WTW GmbH (Weilheim)** : pH-Meter inoLab pH Level 1 mit SenTix 61 pH-Elektrode

### 2.1.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden in p.a. oder reinst Qualität von folgenden Herstellern bezogen.

- **Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)** : Rotiphorese® Acrylamid-Bis Lösung 40 % (19:1), 2-Propanol, RNase AWAY® Lösung, 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat, Ponceau S Rot, Trichloressigsäure, Methanol, Ethanol, DEPC-H<sub>2</sub>O, DTT, Glycerin, TRIS, TRIS (Puffer Qualität), Glycin, NaCl, HCl
- **Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)** : RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor, 6x Orange Loading Dye
- **Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)** : EDTA, KCl, Borsäure, Spermidin
- **GIBCO (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)** : RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin, D-MEM Medium, Trypsin/EDTA, GlutaMAX™-I Supplement, Penicillin-Streptomycin, Fetales Kälberserum (Hitze inaktiviert), PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)
- **Invitek (Berlin)** : 50 x dNTP Master Mix (12,5 mM)
- **Invitrogen (Karlsruhe)** : UltraPure™ Lachs Sperma DNA
- **Merck KGaA (Darmstadt)** : KCl
- **Millipore (Schwalbach/Ts)** : Immobilon Western HRP Substrat
- **Molecular Probes (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)** : SYBR Gold Nukleinsäure-Farbstoff
- **Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)** : Poly(A)-RNA
- **Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)** : HEPES, MgCl<sub>2</sub>, EGTA, DEPC
- **Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)** : Rinderalbumin Fraktion V *receptor grade*, Protease Inhibitor Mix M, Acrylamid-Bis Lösung 40 % (37,5:1), 4 x *Sequencing Solution* (19:1), Triton-X 100, Tween 20

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

- **Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)** : Rotitest®-Temperatur Messstreifen (irreversibel), Gel-Blotting-Papiere Whatman 3MM
- **GE Healthcare Europe GmbH (München)** : HiTrap™ Heparin HP, HiTrap™ Q HP Säulen (1 ml)
- **Invitek GmbH (Berlin)** : Invisorb® Prefilter
- **Millipore (Schwalbach/Ts)** : Immobilon-P PVDV Transfermembran (0,45 µm Porenweite), Amicon® Ultra-15 Zentrifugen Filtereinheiten (MWCO 100 kDa)
- **REATEC AG (Dübendorf-Zürich, Schweiz)** : Temperatur-Indikatoren
- **Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)** : Streptavidin-coated *PCR-Tubes* (Strips)
- **Pierce Biotechnology (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL, USA)** : UltraLink Immobilized NeutrAvidin™ Protein Plus, Spinocolumns mit Schraub- oder Schnappdeckel
- **Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)** : SERVAPOR® Dialyseschlauch (MWCO 12000-14000, Porendurchmesser ca. 25 Å)
- **Vivascience (Sartorius AG, Göttingen)** : Vivapure Q Maxi M Zentrifugationseinheit, Vivaspin 2 Hydrosart® Zentrifugalkonzentrator (MWCO 30 kDa)

### 2.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Cloned AMV</i> Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNaseI, RNase-frei	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RiboShredder™ RNase Blend	EPICENTRE® Biotechnologies, Madison WI, USA
RNase, DNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Invi</i> Taq DNA Polymerase	Invitek GmbH, Berlin
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg
TEMPase Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Biomol GmbH, Hamburg
T4 DNA Ligase, <i>cloned</i>	EPICENTRE® Biotechnologies, Madison WI, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main



### 2.1.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Invisorb® <i>Spin Cell</i> RNA Mini Kit	Invitex GmbH, Berlin
Protein Assay Kit II	Bio-Rad-Laboratories GmbH, München
TRAPEze® Telomerase <i>Detection Kit</i>	Chemicon (Millipore GmbH), Schwalbach/Ts

### 2.1.6 DNA- und Protein-Leitern

#### 2.1.6.1 DNA-Leitern

Marker	Bezeichnung	Hersteller
Marker 1	GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Marker 2	O'RangeRuler™ 5 bp DNA Ladder, <i>ready-to-use</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Marker 3	O'RangeRuler™ 10 bp DNA Ladder, <i>ready-to-use</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Marker 4	100 bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Marker 5	1 Kb DNA Ladder	Gibco (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Marker 6	1 kb DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Marker 7	SERVA DNA Standard pBR 322 x HaeIII	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

#### 2.1.6.2 Protein-Leitern

Marker	Bezeichnung	Hersteller
Marker 8	PageRuler™ Unstained Protein Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Marker 9	PageRuler™ Prestained Protein Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 2.1.7 Antikörper

#### 2.1.7.1 Primäre anti-Telomerase Antikörper

Bezeichnung	Typ, Wirt	Hersteller
Anti-Telomerase (ab177)	Polyklonal, Kaninchen	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Telomerase (Ab-1) (582000)	Polyklonal, Kaninchen	Calbiochem (VWR Intl. GmbH), Darmstadt
Anti-Telomerase (Ab-2) (582005)	Polyklonal, Kaninchen	Calbiochem (VWR Intl. GmbH), Darmstadt
Anti-Telomerase (581400)	Polyklonal, Kaninchen	Calbiochem (VWR Intl. GmbH), Darmstadt

Bezeichnung	Typ, Wirt	Hersteller
<b>Anti-Telomerase (EST21-A)</b>	Polyklonal, Kaninchen	Alpha Diagnostic Intl., Inc., San Antonio TX, USA
<b>TERT(H-231) (sc-7212)</b>	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<b>TERT (L-20) (sc-7214)</b>	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<b>TERT (C-20) (sc-7215)</b>	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<b>Anti-Telomerase (NB100-297SS)</b>	Monoklonal, Maus	Novus Biologicals, Inc., Littleton CO, USA
<b>Anti-Telomerase (GTX20746)</b>	Polyklonal, Ziege	GeneTex®, Inc., San Antonio TX, USA

#### 2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Typ, Wirt	Hersteller
<b>Anti-Kaninchen (P0448)</b>	Polyklonal, HRP-markiert, Ziege	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
<b>Anti-Ziege (sc-2020)</b>	Polyklonal, HRP-markiert, Esel	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<b>Anti-Maus IgG, IgA, IgM (H&amp;L chain) (R1349HRP)</b>	Polyklonal, HRP-markiert, Ziege	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen

#### 2.1.8 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Modifikation	Hersteller
<b>TS-Primer</b>	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'		<b>B</b>
<b>β-TS-Primer</b>	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'	5'-Biotin	<b>B</b>
<b>Primer C</b>	5'-GTTGGATCATATTCGTCCAC-3'		<b>B</b>
<b>Primer D</b>	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCT-3'		<b>B</b>
<b>Primer RT-vor</b>	5'-GAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC-3'		<b>B</b>
<b>Primer RT-rück</b>	5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAGG-3'		<b>B</b>
<b>3'-blocked tDNA</b>	5'-TTGTCTAACCTAAC-3'	3'-ddC	<b>E</b>
<b>ras-TSL</b>	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCTAATCCGTCG AGCAGAGTTAG-3'		<b>E</b>
<b>β-ras-TR</b>	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCTCCTACGCCC TTCTCAGTTAG-3'	5'-Biotin	<b>B</b>
<b>Donor-U4-ras</b>	5'-GGTTAGACAAGTGGACGAATATGATCCAAC-3'	5'-Phosphat	<b>E</b>

Bezeichnung	Sequenz	Modifikation	Hersteller
<b>β-ras-Akzeptor(N)</b>	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCTTAGAATGAACG GTGGAAGGC-3'	5'-Biotin	<b>P</b>
<b>(N)Donor-ras</b>	5'-GGCAGGCCGAGGCTTGTGGACGAATATGATC CAAC-3'	5'-Phosphat	<b>P</b>
<b>β-20n/PS</b>	5'-TCAGATTAGTACTGCTCAGA-3'	5'-Biotin, PS	<b>P</b>
<b>Synthetisches Ligationsprodukt</b>	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCTAATCCGTCGAGCAGA GTTAGGGTTAGACAAGTGGACGAATATGATCCAAC-3'		<b>E</b>

**B** steht für BioTeZ Berlin Buch GmbH (Berlin), **E** für Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) und **P** für Purimex (Giebenstein).

### 2.1.9 Puffer

Reagens	10 x TBE (native PAGE)	10 x TBE (denaturierende PAGE)	10 x TBE (SYBR®-Gold-Färbung)
TRIS	121 g	108 g	107,82 g
Borsäure	61,8 g	55 g	55,02 g
EDTA	7,46 g	—	3,72 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	—	40 ml	—
Endvolumen	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O

Reagens	Ladepuffer (nativ)	Ladepuffer (denaturierend)
1,25 % Bromphenolblau	0,3 ml	0,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8.0)	—	0,5 ml
0,25 M EDTA (pH 8.0)	0,3 ml	—
Glycerin	0,75 ml	—
Formamid	—	4,3 ml
Endvolumen	ad 1,5 ml mit H <sub>2</sub> O	ad 5 ml mit H <sub>2</sub> O

Reagens	20 x TE
0,5 M Tris-HCl (pH 7.5)	10 ml
0,25 M EDTA (pH 8.0)	2 ml
Endvolumen	ad 25 ml mit H <sub>2</sub> O

Reagens	2 x B&W-Puffer
10 x TE (pH 7.5)	5 ml
NaCl	5,84 g
Endvolumen	ad 50 ml mit H <sub>2</sub> O

Reagens	Sammelgelpuffer	Trenngelpuffer
TRIS	12,12 g	72,68 g
10 % SDS	8 ml	16 ml
Endvolumen	ad 200 ml mit H <sub>2</sub> O	ad 400 ml mit H <sub>2</sub> O
Bromphenolblau	1 Spatelspitze	
	pH 6.8 vor SDS-Zugabe mit HCl einstellen	pH 8.8 vor SDS-Zugabe mit HCl einstellen

Reagens	10 x SDS-Laufpuffer
Glycin	144,13 g
TRIS	30,28 g
10 % SDS	100 ml
Endvolumen	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O

Reagens	5 x SDS-Probenpuffer
TRIS	0,76 g
SDS	3 g
β-Mercaptoethanol	5 ml
Glycerin	10 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Endvolumen	100 ml

Reagens	10 x TG
TRIS	30,29 g
Glycin	144,13 g
Endvolumen	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O

Reagens	Transferpuffer
10 x TG	100 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	700 ml
Endvolumen	1 l

Reagens	10 x Waschlösung
NaCl	80,06 g
TRIS	24,23 g
Tween-20	10 ml
Endvolumen	ad 1 l mit H <sub>2</sub> O
pH 7.6 mit HCl einstellen	

Reagens	PonceauS-Rot Färbelösung
PonceauS Rot	1 g
Trichloressigsäure	15 g
Sulfosalicylsäure Dihydrat	17,47 g
Endvolumen	500 ml

Reagens	Lysispuffer	Endkonzentration
0,1 M PMSF	20 µl	0,1 mM
DTT	3,08 mg	1 mM
1 M Tris-HCl (pH 7.4)	200 µl	10 mM
0,25 M EGTA (pH 8.0)	80 µl	1 mM
β-Mercaptoethanol	7,04 µl	5 mM
CHAPS	0,1 g	0,5 % (w/v)
Glycerin	2 ml	10 % (v/v)
1 M MgCl <sub>2</sub>	20 µl	1 mM
	ad 20 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	

Reagens	A <sub>ohne KCl</sub>	A <sub>2 M KCl</sub>	Endkonzentration
HEPES	238,3 mg	238,3 mg	20 mM
0,25 M EDTA (pH 8.0)	40 µl	40 µl	0,2 mM
Glycerin	5 g	5 g	10 % (w/v)
DTT	3,86 mg	3,86 mg	0,5 mM
KCl	—	7,46 g	0 / 2 M
Endvolumen	ad 50 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	
pH 7.62 mit 1 M KOH bei RT einstellen			

Reagens	5 x BCE0	Endkonzentration
1 M TRIS	20 ml	100 mM
0,25 M EDTA (pH 8.0)	400 µl	0,5 mM
0,25 M EGTA (pH 8.0)	400 µl	0,5 mM
0,992 M MgCl <sub>2</sub>	1008 µl	5 mM
Glycerin	100 g	50 % (w/v)
Endvolumen	ad 200 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	

Reagens	BCE0	BCE2000
5 x BCE0	20 ml	20 ml
KCl	—	14,93 g
Endvolumen	ad 100 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 100 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O
pH $7.0 \pm 0.1$ bzw. $8.3 \pm 0.1$ mit 4 N HCl bei RT einstellen		

Puffer **BCE10-BCE1000** wurden aus Puffer **BCE0** und **BCE2000** angesetzt, wobei sich die Zahl auf die KCl-Molarität in mmol/l bezieht.

Reagens	C <sub>ohne KCl</sub>	C <sub>2 M KCl</sub>	Endkonzentration
HEPES	238 mg	238 mg	20 mM
0,25 M EDTA (pH 8.0)	200 µl	200 µl	1 mM
Glycerin	10 g	10 g	20 % (w/v)
0,992 M MgCl <sub>2</sub>	75,6 µl	75,6 µl	1,5 mM
KCl	—	7,46 g	0 / 2 M
Endvolumen	ad 50 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	
pH 7.72 mit 1 M KOH bei RT einstellen			

### 2.1.10 Humane Zelllinien

- **HL-60** : Akute promyelocystische Leukämie Zelllinie
- **HeLa** : Zervixkarzinomzelllinie
- **HUVEC** : Primäre Endothelzelllinie der Nabelschnur
- **Jurkat** : Akute Leukämie T-Zelllinie
- **LoVo** : Kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie
- **SW620** : Kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie

Das HeLa-Zellkernextrakt wurde von der Firma CilBiotech S.A. (Mons, Belgien) bezogen. Die Jurkat-Zellpellets, sowie die genomische DNA aus LoVo und SW620 Zellen, wurden freundlicherweise von der Firma Invitek GmbH (Berlin) hergestellt. Die HUVEC-Zellen wurden freundlicherweise von der Firma provitro GmbH (Berlin) angezogen und zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Methoden

#### 2.2.1.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung von kurzen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurde die native PAGE eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte auf vertikalen Gelen mit einer Größe von ca. 14 x 15 cm x 1,5 mm in einer Hoefer SE 400 Anlage. Folgende Lösung wurde zusammenpipettiert und gegossen :

Reagens	Volumen
H <sub>2</sub> O (dest.)	24,2 ml
10 x TBE-Puffer (native PAGE)	1,75 ml
40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung (19:1)	8,75 ml
10 % APS	245 µl
TEMED	17,5 µl
Endvolumen	35 ml

Nach Aushärten des Gels wurden die Proben, versetzt mit je 2,5 µl Ladepuffer (nativ) oder 5 µl 6x Ladepuffer (Fermentas) pro 25 µl Probe, aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer (native PAGE) benutzt. Die Trennung erfolgte 45 min bei 180 V und dann bis zu 1 h 20 min bei 280 V.

#### 2.2.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung von einzelsträngigen DNA-Fragmenten wurde die denaturierende PAGE und dieselbe Anlage wie in **2.2.1.1** eingesetzt. Folgende Lösung wurde zusammenpipettiert und gegossen :

Reagens	Volumen
H <sub>2</sub> O (dest.)	0,963 ml
10 x TBE-Puffer (denaturierende PAGE)	3,5 ml
4 x <i>Sequencing Solution</i> (19:1)	8,75 ml
8 M Harnstoff	21,5 ml
10 % APS	245 µl
TEMED	17,5 µl
Endvolumen	35 ml

Nach Auspolymerisierung des Gels wurde ein Vorlauf bei 23 W durchgeführt, bis die Temperatur des Gels 45-50 °C betrug. Die Temperatur wurde mit Temperatur-Messstreifen bestimmt. Nach Spülen der Taschen wurde die Probe aufgetragen. Die Proben wurde mit je 8 µl Ladepuffer (denaturierend) pro 10 µl Probe versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert, dann auf Eis gestellt und unverzüglich aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 17 W, und als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer (denaturierende PAGE) eingesetzt.

### 2.2.1.3 SYBR®-Gold Färbung

Die Färbung der Gele erfolgte in einer 1:10.000-Verdünnung der SYBR®-Gold-Stocklösung in 1 x TBE-Puffer (SYBR®-Gold-Färbung) für 20-40 min bei RT auf einer *Mini Rocking Platform* (Taumler). Sie wurde in einer Polypropylen-Schale durchgeführt, und während der Färbung wurde die Färbelösung durch Abdecken vor Licht geschützt. Die Gele wurden anschließend mit einer KODAK ImageStation 440<sub>CF</sub> aufgenommen.

### 2.2.1.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus HeLa-Zellkernextrakt bzw. *Beads* wurde mit dem Invisorb® *Spin Cell* RNA Mini Kit durchgeführt. Die Probe wurde mit je 350 µl Lysispuffer R pro 100 µl HeLa-Zellkernextrakt versetzt bzw. wurden 350 µl Lysispuffer R zu den *Beads* gegeben, wobei das *Beads*-Volumen vernachlässigt wurde. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe in einen DNA-Bindungsfilter übertragen, 1 min inkubiert, und 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Zu dem RNA-haltigen Durchlauf wurden 250 µl 96%-iges Ethanol pro 450 µl Probe (Hela-Zellkernextrakt + Lysispuffer R) bzw. 194 µl pro 350 µl *Beads*-Probe (*Beads* + Lysispuffer R) pipettiert. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe in einen RNA-Bindungsfilter übertragen, 1 min inkubiert, und 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde 1x mit 600 µl Waschpuffer R1 und 3x mit 700 µl Waschpuffer R2 gewaschen, wobei nach jeder Pufferzugabe eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 sec erfolgte. Um Spuren von Ethanol zu entfernen wurde nach dem letzten Waschschrift der RNA-Bindungsfilter bei 12.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 40 µl Elutionspuffer R wurde eine Inkubation für 2 min durchgeführt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge durchgeführt.



Das RNA-haltige Eluat wurde mit 40 U RiboLock™ RNase Inhibitor versetzt, aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

#### *2.2.1.5 Sequenzierung*

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von der Firma Invitek GmbH (Berlin) nach der ABI Fluoreszenz BigDye Terminator Technologie durchgeführt.

#### *2.2.1.6 Auswertung der Abbildungen mit dem Programm Image J*

Die Gele wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J [210] ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nach den Angaben in den einzelnen Menüpunkten auf <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>.

### **2.2.2 Zellbiologische Arbeiten**

#### *2.2.2.1 Anzucht der HL-60 Zellen*

Die HL-60 Zellen wurden als Suspensionskultur in RPMI 1640 Medium, angereichert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> / 95 % relativer Luftfeuchtigkeit angezogen. Sie wurden 2x pro Woche passagiert.

#### *2.2.2.2 Herstellung von HUVEC-Zellpellets*

Die HUVEC-Zellen wuchsen als Monolayerkultur. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen 2x mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Dann wurde Trypsin/EDTA zugegeben und bei RT inkubiert, bis die Zellen anfangen sich zu lösen. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von D-MEM Medium (inkl. 5 % FKS) gestoppt. Die Zellsuspension wurde in D-MEM Medium (inkl. 5 % FKS) überführt, dann 6 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet 1 x mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, und das Zellpellet anschließend auf Trockeneis schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

### 2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

#### 2.2.3.1 Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) mit der Positivkontrolle (3'-blocked tDNA) und einem ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (1:1)

Der ras-TSL und die 3'-blocked tDNA wurden in den angegebenen Verhältnissen zusammenpipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die restlichen Komponenten zugegeben, die Proben in den Thermoblock gestellt und das Programm Prog. (OLA) gestartet.

Reagens	0-Wert zu A	A : (1:1:1)	B : (3:1:1)	C : (6:1:1)	D : (10:1:1)	E : (100:1:1)
500 µM 3'-blocked tDNA	—	—	—	—	—	1 µl
100 µM 3'-blocked tDNA	—	—	—	0,3 µl	0,5 µl	—
5 µM 3'-blocked tDNA	1 µl	1 µl	3 µl	—	—	—
5 µM ras-TSL	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Inkubation : 10 min auf Eis</b>						
DEPC-H <sub>2</sub> O	5,6 µl	4,7 µl	2,7 µl	5,4 µl	5,2 µl	4,7 µl
5 µM Donor-U4-ras	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
10 x Ligationspuffer	1 µl	—	—	—	—	—
25 mM ATP	0,4 µl	—	—	—	—	—
Ligations-Mix	—	2,3 µl	2,3 µl	2,3 µl	2,3 µl	2,3 µl
Endvolumen	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Reagens	Ligations-Mix
T4 DNA Ligase (10 U/µl)	1 µl
10 x Ligationspuffer	10 µl
25 mM ATP	4 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	8 µl
Endvolumen	23 µl

Prog. (OLA)	
4 °C	3 h
94 °C	5 min
4 °C	Pause

#### 2.2.3.2 Vergleich von OLA und OLA+*ΔT* für die Verhältnisse 3'-blocked tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (6:1:1) und (6:1:2)

**Mix I** wurde zusammenpipettiert, je 8 bzw. 4 µl von **Mix I** für 10 min auf Eis inkubiert, dann 12 bzw. 16 µl vom **Mix II** zugegeben, und die Proben in den Thermoblock gestellt. Die T4 DNA Ligase (10 U/µl) wurde auf eine finale Konzentration von 1 U/µl verdünnt. Die

Endkonzentration des Ligationspuffers war 1 x. Von den Ansätzen wurden Doppelwerte pipettiert : mit der einen Hälfte wurde das Programm Prog. (OLA) gestartet, mit der anderen das Programm Prog. (OLA+ $\Delta$ T).

Reagens	0-Wert zu A	A : (6:1:1)	B : (6:1:2)	0-Wert zu C	C : (6:1:1)	D : (6:1:2)
Mix I	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
<b>Inkubation : 10 min auf Eis</b>						
Mix II	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l

Reagens für Mix I	0-Wert zu A	A : (6:1:1)	B : (6:1:2)	0-Wert zu C	C : (6:1:1)	D : (6:1:2)
10 $\mu$ M 3'-blocked tDNA	18 $\mu$ l	18 $\mu$ l	18 $\mu$ l	9 $\mu$ l	9 $\mu$ l	9 $\mu$ l
5 $\mu$ M ras-TSL	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l

Reagens für Mix II	0-Wert zu A	A : (6:1:1)	B : (6:1:2)	0-Wert zu C	C : (6:1:1)	D : (6:1:2)
DEPC-H <sub>2</sub> O	21,6 $\mu$ l	16,2 $\mu$ l	10,2 $\mu$ l	36,6 $\mu$ l	31,2 $\mu$ l	28,2 $\mu$ l
5 $\mu$ M Donor-U4-ras	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	12 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l
10 x Ligationspuffer	6 $\mu$ l	5,4 $\mu$ l	5,4 $\mu$ l	6 $\mu$ l	5,4 $\mu$ l	5,4 $\mu$ l
25 mM ATP	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l)	—	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	—	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l

Prog. (OLA)	
4 °C	3 h
94 °C	5 min
4 °C	Pause

Prog. (OLA+ $\Delta$ T)		
4 °C	10 min	30 x
38 °C	2 min	
94 °C	5 min	
4 °C	Pause	

#### 2.2.3.3 OLA mit der 3'-blocked tDNA und einem ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (1:2)

Der ras-TSL und die 3'-blocked tDNA (3'-bl. tDNA) wurden zusammenpipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der restlichen Komponenten wurden die Proben in den Thermoblock gestellt und Programm Prog. (OLA) wurde gestartet. Die molaren Verhältnisse

der Ligationsprimer und 3'-blocked tDNA in den einzelnen Ansätzen sind in Tabelle 4 im Ergebniskapitel wiedergegeben.

Reagens	0-Wert 1	0-Wert 2	A	B	C	D	E	F	G	H
10 µM 3'-bl. tDNA	3 µl	—	—	—	—	3 µl	—	1,8 µl	3 µl	3 µl
1 µM 3'-bl. tDNA	—	—	—	3 µl	3 µl	—	9 µl	—	—	—
0,1 µM 3'-bl. tDNA	—	—	3 µl	—	—	—	—	—	—	—
10 µM ras-TSL	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	0,9 µl	3 µl	—	—	—	—
1 µM ras-TSL	—	—	—	—	—	—	3 µl	3 µl	3 µl	—
0,1 µM ras-TSL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 µl
<b>Inkubation : 10 min auf Eis</b>										
DEPC-H <sub>2</sub> O	13,8 µl	14,1 µl	11,1 µl	11,1 µl	17,4 µl	11,1 µl	5,1 µl	12,3 µl	11,1 µl	11,1 µl
10 µM Donor-U4-ras	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	1,8 µl	6 µl	—	—	—	—
1 µM Donor-U4-ras	—	—	—	—	—	—	6 µl	6 µl	6 µl	—
0,1 µM Donor-U4-ras	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6 µl
10 x Ligationspuffer	3 µl	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25 mM ATP	1,2 µl	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ligations-Mix	—	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl	6,9 µl

Reagens	Ligations-Mix
T4 DNA Ligase (10 U/µl)	4 µl
10 x Ligationspuffer	40 µl
25 mM ATP	16 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	32 µl
Endvolumen	92 µl

Prog. (OLA)	
4 °C	3 h
95 °C	5 min
4 °C	Pause

#### 2.2.3.4 OLA mit der aufgereinigten Telomerase bei gleichbleibender Telomerase-Menge

In dem Versuch wurde Probe **K** aus 2.2.4.7 eingesetzt. Probe **K** bzw. die 3'-blocked tDNA wurden mit dem ras-TSL zusammenpipettiert, 10 min auf Eis inkubiert, dann die restlichen Komponenten zugegeben, und der OLA im Thermoblock gestartet. Die T4 DNA Ligase (10 U/µl) wurde auf eine finale Konzentration von 1 U/µl verdünnt. Die Endkonzentration des Ligationspuffers war 1 x.

Reagens	0-Wert zu A	Positiv- kontrolle	A	B	C	D	E
Probe <b>K</b>	1 µl	—	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
100 µM 3'- <i>blocked</i> tDNA	—	1,5 µl	—	—	—	—	—
5 µM ras-TSL	5 µl	5 µl	5 µl	—	—	—	—
5 x 10 <sup>-1</sup> µM ras-TSL	—	—	—	5 µl	—	—	—
5 x 10 <sup>-2</sup> µM ras-TSL	—	—	—	—	5 µl	—	—
5 x 10 <sup>-3</sup> µM ras-TSL	—	—	—	—	—	5 µl	—
5 x 10 <sup>-4</sup> µM ras-TSL	—	—	—	—	—	—	5 µl
<b>Inkubation : 10 min auf Eis</b>							
10 µM Donor-U4-ras	5 µl	5 µl	5 µl	—	—	—	—
10 x 10 <sup>-1</sup> µM Donor-U4-ras	—	—	—	5 µl	—	—	—
10 x 10 <sup>-2</sup> µM Donor-U4-ras	—	—	—	—	5 µl	—	—
10 x 10 <sup>-3</sup> µM Donor-U4-ras	—	—	—	—	—	5 µl	—
10 x 10 <sup>-4</sup> µM Donor-U4-ras	—	—	—	—	—	—	5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	9 µl	7,75 µl	—	—	—	—	—
10 x Ligationspuffer	2,5 µl	2,25 µl	—	—	—	—	—
25 mM ATP	—	1 µl	—	—	—	—	—
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	2,5 µl	2,5 µl	—	—	—	—	—
Ligations-Mix	—	—	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl

Reagens	Ligations-Mix
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	17,5 µl
10 x Ligationspuffer	15,75 µl
25 mM ATP	7 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	57,75 µl
Endvolumen	98 µl

Prog. (OLA)	
4 °C	3 h
94 °C	5 min
4 °C	Pause

#### 2.2.3.5 OLA mit der aufgereinigten Telomerase bei gleichbleibender Ligationsprimer-Menge

In dem Versuch wurde Probe **K** aus 2.2.4.7 eingesetzt. Probe **K**, Verdünnungen von Probe **K** bzw. die 3'-*blocked* tDNA wurden mit dem ras-TSL zusammenpipettiert, 10 min auf Eis inkubiert, dann die restlichen Komponenten zugegeben, und der OLA im Thermoblock gestartet. Probe **K** wurde in 1 x Ligationspuffer oder Dialysepuffer verdünnt. Die T4 DNA Ligase (10 U/µl) wurde auf eine finale Konzentration von 1 U/µl verdünnt. Die Endkonzentration des Ligationspuffers war 1 x.

Reagens	0-Wert zu a	Positiv- kontrolle	a	b	c	d	e
100 $\mu\text{M}$ 3'- <i>blocked</i> tDNA	—	5 $\mu\text{l}$	—	—	—	—	—
Probe <b>K</b>	5 $\mu\text{l}$	—	5 $\mu\text{l}$	—	—	—	—
(1:10)-Verdünnung von Probe <b>K</b>	—	—	—	5 $\mu\text{l}$	—	—	—
(1:10 <sup>2</sup> )-Verdünnung von Probe <b>K</b>	—	—	—	—	5 $\mu\text{l}$	—	—
(1:10 <sup>3</sup> )-Verdünnung von Probe <b>K</b>	—	—	—	—	—	5 $\mu\text{l}$	—
(1:10 <sup>4</sup> )-Verdünnung von Probe <b>K</b>	—	—	—	—	—	—	5 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ ras-TSL	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
<b>Inkubation : 10 min auf Eis</b>							
10 $\mu\text{M}$ Donor-U4-ras	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
DEPC-H <sub>2</sub> O	6,5 $\mu\text{l}$	4,25 $\mu\text{l}$	4,25 $\mu\text{l}$	4,75 $\mu\text{l}$	4,75 $\mu\text{l}$	4,75 $\mu\text{l}$	4,75 $\mu\text{l}$
10 x Ligationspuffer	2,5 $\mu\text{l}$	2,25 $\mu\text{l}$	2,25 $\mu\text{l}$	1,75 $\mu\text{l}$	1,75 $\mu\text{l}$	1,75 $\mu\text{l}$	1,75 $\mu\text{l}$
25 mM ATP	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ )	—	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$

<b>Prog. (OLA)</b>	
4 °C	3 h
94 °C	5 min
4 °C	Pause

#### 2.2.3.6 Modifizierter OLA mit der hTR und den $\beta$ -ras-TR/Donor-U4-ras bzw.

##### *$\beta$ -ras-Akzeptor(N)/(N)Donor-ras Ligationsprimerpaaren*

Die Versuchsbedingungen wurden den Publikationen von Nilsson et al. [211,212], Hoffman et al. [213], sowie dem Dynabeads®M-280 Streptavidin-Datenblatt entnommen und modifiziert. Im ersten Schritt des modifizierten OLAs wurde RNA, isoliert aus 80  $\mu\text{l}$  HeLa-Zellkernextrakt mit DNaseI verdaut. In diesem Schritt sollte eventuell mitisolierte genomische DNA entfernt werden. Zu dem DNaseI-Verdau wurden die restlichen Komponenten gegeben, und die Ligationsreaktion im Thermoblock gestartet (Prog. (mod. OLA)). Nach der Inkubation bei 70 °C für 15 min, welche zur Denaturierung der RNA:DNA-Hybride diente, wurde ein RNase-Verdau durchgeführt, um die RNA aus dem Ansatz zu entfernen.

In Ansätze **A-D**, **0-Wert 2** und die **Positivkontrolle** wurden der  **$\beta$ -ras-TR** (Akzeptor) und der **Donor-U4-ras** (Donor) pipettiert, in Ansätze **a-d** der  **$\beta$ -ras-Akzeptor(N)** (Akzeptor) und der **(N)Donor-ras** (Donor). 3'-bl. tDNA steht für 3'-*blocked* tDNA.

Reagens	A	B	C	D	0-Wert 2	Positiv- kontrolle
	a	b	c	d		
Mix (ohne)	44,55 $\mu$ l	—	—	—	—	—
Mix (RNA)	—	44,55 $\mu$ l	44,55 $\mu$ l	44,55 $\mu$ l	—	—
Mix (3'-bl. tDNA)	—	—	—	—	44,55 $\mu$ l	44,55 $\mu$ l
2,5 $\mu$ M Akzeptor	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	—	—	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
1,25 $\mu$ M Akzeptor	—	—	1 $\mu$ l	—	—	—
0,625 $\mu$ M Akzeptor	—	—	—	1 $\mu$ l	—	—
5 $\mu$ M Donor	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	—	—	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
2,5 $\mu$ M Donor	—	—	1 $\mu$ l	—	—	—
1,25 $\mu$ M Donor	—	—	—	1 $\mu$ l	—	—
<b>Inkubation : 5 min bei 55 °C =&gt; Abkühlen auf 25 °C =&gt; sofort auf Eis stellen</b>						
T4 DNA Ligase (10 U/ $\mu$ l)	2,45 $\mu$ l	2,45 $\mu$ l	2,45 $\mu$ l	2,45 $\mu$ l	—	2,45 $\mu$ l
DEPC-H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	2,45 $\mu$ l	—
<b>Prog. (mod. OLA) =&gt; sofort auf Eis stellen</b>						
RiboShredder™RNase Blend (1 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>Inkubation : 10 min bei 37 °C</b>						

Reagens	Mix (RNA)	Mix (3'-bl. tDNA)	Mix (ohne)
HeLa-RNA	18,6 $\mu$ l	—	—
DEPC-H <sub>2</sub> O	—	7,5 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l
DNaseI-Mix	31 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
<b>Inkubation : 30 min bei 37 °C</b>			
25 mM EDTA	6,2 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
<b>Inkubation : 10 min bei 65 °C</b>			
10 $\mu$ M 3'- <i>blocked</i> tDNA	—	3,75 $\mu$ l	—
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	7,75 $\mu$ l	3,125 $\mu$ l	3,125 $\mu$ l
10 x Ligationspuffer	30,38 $\mu$ l	12,25 $\mu$ l	12,25 $\mu$ l
25 $\mu$ M ATP	12,152 $\mu$ l	—	4,9 $\mu$ l
25 mM ATP	—	4,9 $\mu$ l	—
DEPC-H <sub>2</sub> O	170,13 $\mu$ l	64,85 $\mu$ l	68,6 $\mu$ l

Reagens	DNaseI-Mix
10 x DNaseI-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	10,4 µl
DNaseI, RNase-frei (1 U/µl)	13 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)	2,925 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	38,68 µl
Endvolumen	65 µl

Prog. (mod. OLA)	
37 °C	1 h
70 °C	15 min

Nach dem RNase-Verdau wurden je 5 bzw. 25 µl der Ansätze mit 25 µl 2 x B& W-Puffer versetzt, wobei zu den 5 µl-Ansätzen zusätzlich noch 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O zugegeben wurden. Dann wurden die Proben in Streptavidin-beschichtete PCR-*Tubes* überführt. Es folgte eine Inkubation bei RT auf einer *Mini Rocking Platform* (Taumler) für 45 min. Anschließend wurden die PCR-*Tubes* 6x mit je 250 µl 1 x B& W-Puffer, 1x mit 250 µl und 1x mit 100 µl 1 x TE-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden zu jedem PCR-*Tube* je 50 µl **PCR-Mix** zugegeben und das Programm Prog. (ras-Hot 2) gestartet.

Reagens	PCR-Mix
10 x Hot Start Puffer	5 µl
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
50 x dNTPs (je 12,5 mM)	0,8 µl
15 µM Primer <b>C</b>	2 µl
15 µM Primer <b>D</b>	2 µl
H <sub>2</sub> O	36,8 µl
Endvolumen	50 µl

Prog. (ras-Hot 2)	
95 °C	10 min
94 °C	30 sec
<b>64,5 °C</b>	30 sec
72 °C	1 min
72 °C	5 min
4 °C	Pause

#### 2.2.3.7 *ras*-PCR (Gradienten-PCR) mit genomischer DNA und *Taq* DNA Polymerase

Es wurde eine Gradienten-PCR mit 12 unterschiedlichen T<sub>a</sub> durchgeführt. Bei jeder T<sub>a</sub> wurde ein 0-Wert und eine Probe mit genomischer DNA als Template untersucht. Es wurden je 23 µl von jedem **PCR-Mix** bei den entsprechenden T<sub>a</sub> eingesetzt.



Reagens	0-Wert	Probe
10 x Reaktionspuffer	24,7 µl	24,7 µl
<i>Invi</i> Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	4,55 µl	4,55 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	15,6 µl	15,6 µl
50 x dNTPs (je 12,5 mM)	1,95 µl	1,95 µl
15 µM Primer <b>C</b>	13 µl	13 µl
15 µM Primer <b>D</b>	13 µl	13 µl
Genomische DNA (50 µg/ml)	—	13 µl
H <sub>2</sub> O	244 µl	231 µl
Endvolumen	317 µl	317 µl

PCR-Programm		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	<b>35 x</b>
<b>62-76 °C</b>	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	Pause	

#### 2.2.3.8 *ras*-PCR mit Taq DNA Polymerase

Zu je 1 µl Probe wurden 24 µl **PCR-Mix** zugegeben und das PCR-Programm Prog. (ras) gestartet.

Reagens	PCR-Mix
10 x Reaktionspuffer	1,9 µl
<i>Invi</i> Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,35 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
50 x dNTPs (je 12,5 mM)	0,15 µl
15 µM Primer <b>C</b>	1 µl
15 µM Primer <b>D</b>	1 µl
H <sub>2</sub> O	18,4 µl
Endvolumen	24 µl

Prog. (ras)		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	<b>35 x</b>
<b>66 °C</b>	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	Pause	

#### 2.2.3.9 *ras*-PCR (Gradienten-PCR) mit Hot Start Taq DNA Polymerase

Es wurde eine Gradienten-PCR mit 12 unterschiedlichen T<sub>a</sub> durchgeführt. Bei jeder T<sub>a</sub> wurde ein 0-Wert und eine Probe mit genomischer DNA als Template untersucht. Die Ansätze hatten ein Volumen von 25 µl.

Reagens	0-Wert	Probe
10 x Hot Start Puffer	2,5 µl	2,5 µl
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	1,5 µl
50 x dNTPs (je 12,5 mM)	0,4 µl	0,4 µl
15 µM Primer <b>C</b>	1 µl	1 µl
15 µM Primer <b>D</b>	1 µl	1 µl
Genomische DNA (50 µg/ml)	—	1 µl
H <sub>2</sub> O	18,4 µl	17,4 µl
Endvolumen	25 µl	25 µl

PCR-Programm		
95 °C	10 min	
94 °C	30 sec	35 x
60-72 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	Pause	

### 2.2.3.10 *ras*-PCR mit Hot Start *Taq* DNA Polymerase

Zu je 1 µl Probe wurden 24 µl **PCR-Mix** zugegeben und das PCR-Programm Prog. (ras-Hot 1) gestartet.

Reagens	PCR-Mix
10 x Hot Start Puffer	2,5 µl
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
50 x dNTPs (je 12,5 mM)	0,4 µl
15 µM Primer <b>C</b>	1 µl
15 µM Primer <b>D</b>	1 µl
H <sub>2</sub> O	17,4 µl
Endvolumen	24 µl

Prog. (ras-Hot 1)		
95 °C	10 min	
95 °C	30 sec	35 x
66 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	Pause	

### 2.2.3.11 Test des HL-60-Lysats auf DNasen

Zu 25 pmol (155,3 ng) β-TS-Primer bzw. 155,5 ng Marker 6 wurden 10 µl HL-60-Lysat zugegeben, und der Ansatz wurde auf 40 µl mit Lysispuffer aufgefüllt. Die Kontrollen ohne Lysat enthielten anstelle des Lysats, 10 µl Lysispuffer. Die Proben wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, dann mit je 0,4 µl RNase (0,5 mg/ml) versetzt und für 1 h bei 37 °C verdaut. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 95 °C.

### 2.2.3.12 DNaseI-Verdau

3 µl der isolierten RNA bzw. 1 µl Marker 4 (0,5 µg/µl) wurden mit 5 µl **DNaseI-Mix** versetzt. Bei den Proben, die Marker 4 enthielten, wurden auf das Endvolumen von 8 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, dann wurde je 1 µl 25 mM EDTA zugegeben. Es folgte eine Inaktivierung der DNaseI für 10 min bei 65 °C.

Reagens	DNaseI-Mix
10 x DNaseI-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	0,8 µl
DNaseI, RNase-frei (1 U/µl)	1 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,225 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,975 µl
Endvolumen	5 µl

### 2.2.3.13 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Bedingungen für die RT-PCR wurden den Publikationen von Novakovic et al. [214], Fuller et al. [215], Chen et al. [216] und dem *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis* Kit-Datenblatt entnommen.

#### 2.2.3.13.1 cDNA-Herstellung

Zu 9 µl DNaseI-Verdau (s. 2.2.3.12) wurden 3 µl **Mix 1** gegeben und 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt, und 8 µl **Mix 2** auf Eis zugegeben. Die Proben wurden in den Thermocycler gestellt und das Programm Prog. (cDNA) wurde gestartet.

Reagens	Mix 1	Mix 2
Random Hexamer Primer (50 ng/µl)	1 µl	—
10 mM dNTP-Mix	2 µl	—
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)	—	1 µl
5 x cDNA Synthese Puffer	—	4 µl
0,1 M DTT	—	1 µl
Cloned AMV RT (15 U/µl)	—	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	—	1 µl
Endvolumen	3 µl	8 µl

Prog. (cDNA)	
25 °C	10 min
50 °C	50 min
85 °C	5 min
4 °C	Pause

2.2.3.13.2 PCR zur Amplifikation der cDNA

Es wurden zwei Hot Start *Taq* DNA Polymerasen eingesetzt : die Hot Start *Taq* DNA Polymerase von Fermentas **(1)** bzw. die TEMPase Hot Start *Taq* DNA Polymerase von Biomol **(2)**. Je 2 µl der cDNA-Ansätze wurden mit je 15 oder 23 µl **PCR-Mix (1)** bzw. je 40 µl **PCR-Mix (2)** versetzt und das Programm Prog. (RT-PCR) wurde gestartet. Bei den Ansätzen, welche mit 15 µl **PCR-Mix (1)** versetzt wurden, wurden je 0,86 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> zu den Proben gegeben, während es im Mix fehlte. Bei den Ansätzen, zu welchen 23 µl **PCR-Mix (1)** gegeben wurde, war das MgCl<sub>2</sub> im Mix enthalten (\*). Die Ansätze **(1)** wurden auf das Endvolumen von 25 µl, die Ansätze **(2)** auf das Endvolumen von 50 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Reagens	PCR-Mix (1)	PCR-Mix (2)
10 x Puffer I <b>(2)</b>	—	5 µl
10 x Hot Start Puffer <b>(1)</b>	2,5 µl	—
TEMPase Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	—	1 µl
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	—
50 x dNTPs (je 12,5 mM)	0,4 µl	0,8 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub> *	0,86 µl *	—
15 µM Primer <b>RT-vor</b>	0,5 µl	1 µl
15 µM Primer <b>RT-rück</b>	0,5 µl	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	10,9 / 18,04 µl	31,2 µl
Endvolumen	15 / 23 µl	40 µl

Prog. (RT-PCR)		
95 °C	10 / 15 min	
95 °C	30 sec	35 x
65 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	Pause	

#### 2.2.3.14 Optimierung der Beschichtung der NeutrAvidin™ Protein Plus Beads mit $\beta$ -20n/PS

140  $\mu$ l NeutrAvidin™ Protein Plus Beads-Suspension wurden 1x mit 1 ml Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen und in 70  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> aufgenommen. Je 40  $\mu$ l Aliquots (20  $\mu$ l Beads) wurden abzentrifugiert, der Überstand entfernt, und 95,2  $\mu$ l **Mix (Hyb.)** zugegeben. Die Lösungen wurden mit 1,6 / 2,4 / 4,8  $\mu$ l 0,1 mM  $\beta$ -20n/PS versetzt und auf 100  $\mu$ l mit 1 x TE-Puffer aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation bei RT für 1 h und 1000 x rpm im Thermomixer. Die Beads wurden in einen äquilibrierten Invisorb® Prefilter gegeben, und 4x mit je 200  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen. Alle Zentrifugationen wurden in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge bei RT und 45 x g für 1-2 min durchgeführt.

Reagens	A <sub>100 mM KCl</sub>	Mix (Hyb.)
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	50 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	950 $\mu$ l	90,2 $\mu$ l
Endvolumen	1000 $\mu$ l	95,2 $\mu$ l

#### 2.2.3.15 Direkter Telomerase-Assay mit dem HL-60-Lysat

Der direkte Telomerase-Assay wurde basierend auf den Angaben von Pascolo et al. [217], nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt. Die Ansätze enthielten 2,5  $\mu$ M  $\beta$ -TS-Primer, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, je 1 mM dTTP, dATP und dGTP, 1 mM Spermidin, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, und die entsprechende Menge HL-60-Lysat (s. 3.1.1). Das Endvolumen betrug 40  $\mu$ l. Die Kontrolle ohne  $\beta$ -TS-Primer enthielt das entsprechende Volumen 1 x TE-Puffer, die Kontrolle ohne HL-60-Lysat, das entsprechende Volumen Lysispuffer. Die Ansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, dann mit je 0,4  $\mu$ l RNase (0,5 mg/ml) versetzt. Die Kontrolle ohne  $\beta$ -TS-Primer wurde nicht mit RNase verdaut. Es wurde eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert, danach 5 min bei 95 °C.

#### 2.2.3.16 Ein-Schritt TRAP-Assay mit Taq DNA Polymerase

Zu je 2  $\mu$ l Probe wurden 23  $\mu$ l **TRAP-Mix** zugegeben, und das Programm Prog. (TRAP) im Thermoblock gestartet. Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert.

Reagens	TRAP-Mix
10 x TRAP-Puffer	2,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,22 µl
50 x Primer-Mix	0,5 µl
50 x dNTPs	0,5 µl
5 µM β-TS-Primer	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	18,28 µl
Endvolumen	23 µl

Prog. (TRAP)		
4 °C	10 min	
30 °C	10 min	
94 °C	5 min	
94 °C	45 sec	30 x
56 °C	45 sec	
60 °C	45 sec	
4 °C	Pause	

#### 2.2.3.17 Direkter TRAP-Assay mit Hot Start *Taq* DNA Polymerase

Zu je 2-15 µl Probe (bei kleineren Proben wurde auf das entsprechende Volumen mit Puffer aufgefüllt) wurden 23-10 µl **PCR-Mix** auf Eis gegeben, die Ansätze in den Thermoblock gestellt und das Programm Prog. (TRAP-Hot 1) gestartet.

Reagens	PCR-Mix
10 x TRAP-Puffer	2,5 µl
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,22 µl
50 x Primer-Mix	0,5 µl
50 x dNTPs	0,5 µl
TS-Primer	0,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	5,78-18,78 µl
Endvolumen	10-23 µl

Prog. (TRAP-Hot 1)		
4 °C	5 min	
30 °C	30 min	
95 °C	10 min	
94 °C	45 sec	30 x
56 °C	45 sec	
60 °C	45 sec	
4 °C	Pause	

#### 2.2.3.18 Zwei-Schritt TRAP-Assay mit Hot Start *Taq* DNA Polymerase

Dieser TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden zu 4-8 µl Probe (bei kleineren Probenmengen wurde bis 4 bzw. 8 µl mit Puffer aufgefüllt) 16-12 µl **Mix 1** auf Eis zugegeben. Die Proben wurden in den Thermoblock gestellt und Programm Prog. (Telomerase-Rkt. 1) gestartet. Dann wurden die Ansätze verdünnt, und zu einem Aliquot der Verdünnung 10–20 µl **Mix 2** zugegeben. Es wurde das Programm Prog. (TRAP-Hot 2) benutzt.

Reagens	Mix 1
10 x TRAP-Puffer	2 µl
10 mM je dATP, dTTP, dGTP	0,1 µl
50 µM TS-Primer	0,08 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	9,82-13,82 µl
Endvolumen	12-16 µl

Prog. (Telomerase-Rkt. 1)	
4 °C	5 min
30 °C	30 min
94 °C	5 min
4 °C	Pause

Reagens	Mix 2
10 x Hot Start Puffer	2,5 µl
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
50 x Primer-Mix	0,5 µl
dNTPs (je 12,5 mM)	0,4 µl
50 µM TS-Primer	0,1 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	4,8-14,8 µl
Endvolumen	10-20 µl

Prog. (TRAP-Hot 2)	
95 °C	10 min
94 °C	45 sec
56 °C	45 sec
60 °C	45 sec
4 °C	Pause

Bei einem Teil der Versuche wurden in **Mix 1** nicht 0,08 µl 50 µM TS-Primer/Ansatz, sondern 2 µl zugegeben. Diese Ansätze wurden nach der Telomerase-Reaktion (1:4)-verdünnt, und 5 µl der Verdünnung wurden in die PCR gegeben. In **Mix 2** wurde bei diesen Versuchen der TS-Primer weggelassen.

#### 2.2.3.19 TRAP-Assay mit dem *ras*-TSL als Substrat

Zu je 1 µl Probe **K** aus 2.2.4.7 wurden je 18 bzw. 19 µl **Mix 1** zugegeben und das Programm Prog. (Telomerase-Rkt. 2) gestartet. Die Ansätze wurden anschließend 1:4 verdünnt, und je 20 µl Mix 2 wurde zu je 5 µl der Verdünnungen gegeben. Es wurde das PCR-Programm Prog. (TRAP-Hot 3) benutzt.

Reagens	Mix 1
10 x TRAP-Puffer	2 µl
10 mM je dATP, dTTP, dGTP	0,1 µl
50 µM β-TS-Primer bzw. <i>ras</i> -TSL	2 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	13,9 / 14,9 µl
Endvolumen	18 / 19 µl

Prog. (Telomerase-Rkt. 2)	
30 °C	10 min / 2 h
94 °C	5 min
4 °C	Pause

Reagens	Mix 2
10 x Puffer I	2,5 µl
TEMPase Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
50 x Primer-Mix	0,5 µl
dNTPs (je 12,5 mM)	0,4 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	16,1 µl
Endvolumen	20 µl

Prog. (TRAP-Hot 3)		
95 °C	15 min	
94 °C	45 sec	30 x
56 °C	45 sec	
60 °C	45 sec	
4 °C	Pause	

*2.2.3.20 TRAP-Assay zur Bestimmung der  $\beta$ -20n/PS-Menge, benötigt zur Hemmung der Telomerase aus 1 µl HeLa-Zellkernextrakt*

Dieser TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden zu je 1 µl HeLa-Zellkernextrakt 5-50 pmol  $\beta$ -20n/PS zugegeben und die Ansätze wurden auf 6 µl mit 1 x TE-Puffer oder CHAPS-Puffer (für die Kontrolle) aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 30 °C, dann wurden je 14 µl **Mix 1** auf Eis zugegeben, die Proben in den Thermoblock gestellt und das Programm Prog. (Telomerase-Rkt. 1) gestartet. Die Ansätze wurden (1:100) verdünnt und zu je 5 µl der Verdünnungen wurden 20 µl **Mix 2** zugegeben und Programm Prog. (TRAP-Hot 3) gestartet. Die Zusammensetzung von **Mix 1** sowie das Prog. (Telomerase-Rkt. 1) sind in **2.2.3.18** beschrieben, Prog. (TRAP-Hot 3) in **2.2.3.19**.

Reagens	Mix 2
10 x Puffer I	2,5 µl
TEMPase Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
50 x Primer-Mix	0,5 µl
dNTPs (je 12,5 mM)	0,4 µl
50 µM TS-Primer	0,1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	16 µl
Endvolumen	20 µl

In den Versuchen, beschrieben in **2.2.3.16 – 2.2.3.20**, wurden die Komponenten des TRAPeZe<sup>®</sup> Telomerase *Detection Kits* eingesetzt.



## 2.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde das Protein Assay Kit II eingesetzt, für die Erstellung der Eichgeraden der Bio-Rad Protein Assay Standard II (Rinderserumalbumin). Mit dem Standard wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen angesetzt : 0,06 / 0,12 / 0,24 / 0,36 / 0,48 / 0,6 / 0,72 µg/µl in DEPC-H<sub>2</sub>O. Von den Proben bzw. von diesen Standardlösungen wurden je 10 µl (Doppelwerte) in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurden 250 µl 1 x Farbstoffreagens zugegeben, 5 min bei RT inkubiert, und anschließend die Proben bei 570 nm in einem Anthos Labtec HT2 Photometer vermessen.

### 2.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE. Hierzu wurde ein vertikales PerfectBlue™ Twin S Doppelgel-Elektrophoresesystem eingesetzt. Die Gele hatten eine Größe von 10 cm x 10 cm x 0,8 mm. Es wurde ein 7,5 %-iges Trenngel bis ca. 1 cm unter dem Kamm gegossen, und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die Taschen ausgespült, und die Proben aufgetragen. Hierzu wurden die Proteinproben mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Wenn die Proben bei – 20 °C zwischengelagert werden mussten, wurden sie zum Auftauen bei 37 °C inkubiert.

Reagens	Sammelgel (3,9 %)	Trenngel (7,5 %)
	Volumen	Volumen
H <sub>2</sub> O (dest.)	3,213 ml	8,437 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	—
Trenngelpuffer	—	3,75 ml
40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	0,488 ml	2,813 ml
10 % APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Die Trennung erfolgte bei 15 mA / Gel in 1 x SDS-Laufpuffer, bis die Bromphenolblau-Front das Ende der Gele erreichte bzw. auslief.

#### 2.2.4.3 Western-Blot Analyse

Die Proteine wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt, wie in 2.2.4.2 beschrieben. Die Western-Blot-Bedingungen wurden in Anlehnung an Wenz et al. [218] gewählt. Nach dem Lauf wurden die Gele auseinandergebaut und in Transferpuffer für 10-15 min äquilibriert. Die Immobilon-P PVDF Transfermembran wurde in 100 % Methanol eingeweicht, bis sie von opak halbdurchsichtig wurde, und dann für mind. 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Gel-Blotting-Papiere Whatman 3MM wurden mind. 30 sec in Transferpuffer äquilibriert. Für den Proteintransfer wurde eine Mini Trans-Blot® Elektrophoretische Transferzelle benutzt. Der Transfer-Stapel wurde folgendermaßen zusammengebaut : auf das Gel wurde die Transfermembran, dann auf beiden Filterpapier, und auf die Filterpapiere Faserschwämme gelegt. Das Gel-Sandwich wurde in die Kassette gelegt und der Transfer für 1 h bei 300 mA durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine wurde seine Effektivität mittels einer PonceauS Rot-Färbung kontrolliert, und der Marker eingezeichnet. Die Membran wurde 1 h bei RT mit 5 % Magermilchpulver und 1% BSA in 1 x Waschlösung blockiert. Der erste Antikörper TERT (H-231) aus Kaninchen wurde (1:1000) in 1 x Waschlösung, welche 2,5 % Magermilchpulver und 0,5 % BSA enthielt, verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° C. Der zweite Antikörper (anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege), mit einer HRP-Markierung, wurde (1:20.000) in 1 x Waschlösung, die 2,5 % Magermilchpulver und 0,5 % BSA enthielt, verdünnt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT. Die anderen getesteten ersten wie auch sekundären Antikörper wurden nach den Empfehlungen der Hersteller sowie des HRP-Substrat-Datenblatts eingesetzt. Nach jeder Antikörper-Inkubation wurde die Membran 3x für ein paar Sekunden, dann 3x für 5 min auf einer *Mini Rocking Platform* (Taumler) mit 1 x Waschlösung gewaschen. Als HRP-Substrat wurde das Immobilon™ Western Chemilumineszierende HRP Substrat eingesetzt. Gleiche Teile von der Luminol Reagens und der Peroxid Lösung wurden gemischt, und die Mischung auf RT aufgewärmt. Die einsatzbereite Lösung wurde auf die Membran gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Der Blot wurde mit einer KODAK ImageStation 440<sub>CF</sub> aufgenommen.

#### 2.2.4.4 Herstellung von $\ddot{U}_{100}$ -Lysaten aus HL-60 Zellen

Die  $\ddot{U}_{100}$ -Lysate wurden nach den modifizierten Angaben von Francis und Friedman [219] hergestellt. Die HL-60 Zellen wurden geerntet und 2x mit RT-warmem PBS (ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen. Die Zentrifugation bei den Waschschritten erfolgte bei 3000 rpm und 4 °C für 6 min in einer Eppendorf Zentrifuge 5402. Das Pellet wurde in 177,8  $\mu$ l kaltem Lysispuffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurde die Probe mit Hilfe eines Vortexer VF2 gemischt. Nach der Inkubation folgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000 x g und 4 °C für 1 h. Der Überstand wurde durch die Zugabe von 22,2  $\mu$ l 100 %-igem Glycerin auf einen Glycerin-Gehalt von 20 % eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

#### 2.2.4.5 Herstellung von Jurkat- und HUVEC-Lysaten

Das Jurkat- bzw. HUVEC-Zellpellet (s. 2.1.10 und 2.2.2.2) wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden 1  $\mu$ l RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l 100x Protease Inhibitor Mix M und 197  $\mu$ l Puffer A<sub>ohne KCl+0,5% TX</sub> zugegeben, und das Pellet resuspendiert. Für die Herstellung des CHAPS-Puffer-Lysats wurden zu dem Pellet 200  $\mu$ l CHAPS-Puffer aus dem TRAPeZe® Telomerase Detection Kit und 1  $\mu$ l RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) gegeben. Die Probe wurde 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch angevortext. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation in der Eppendorf Zentrifuge 5402 bei 14.000 rpm ( $\approx$  16.000 x g) und 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

#### 2.2.4.6 Aufreinigung der Telomerase aus HL-60 Zellen mittels FPLC

Die HL-60 Zellen wurden geerntet und 2x mit RT-warmem PBS (ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen. Die Zentrifugation bei den Waschschritten erfolgte bei 3000 rpm und 4 °C für 6 min in einer Eppendorf Zentrifuge 5402. Die Zellpellets wurden in je 200  $\mu$ l kaltem BCE100-Puffer (inkl. 1 x Protease Inhibitor Mix M) mit pH<sub>4°C</sub> 7.6 resuspendiert. Jede Probe wurde aufgeteilt, und durch Ultraschall lysiert. Es wurden ein Ultraschall-Homogenisator bei 4 °C (Kühlraum) eingesetzt. Die Beschallung erfolgte bei maximaler Kapazität für 105 sec (30 / 30 / 45 sec-Intervalle, zwischen den Intervallen wurden die Proben auf Eis gestellt, um ein Erwärmen zu vermeiden). Die Lysate wurden bei 100.000 x g und 4 °C für 1 h

ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden gepoolt, und der Pool mit BCE100-Puffer (inkl. 1 x Protease Inhibitor Mix M) mit pH<sub>4°C</sub> 7.6 auf 3 ml (Probe **L**) aufgefüllt. **L** wurde auf die äquilibrierte HiTrap Q HP Säule (1 ml Säulenvolumen) aufgetragen, der Durchlauf (**D1**) gesammelt. **D1** wurde nochmals auf die Säule aufgetragen. Die beladene Säule wurde mit 10 Säulenvolumina (10 ml) Puffer BCE100 (pH<sub>4°C</sub> 7.6) gewaschen. Dann wurde ein linearer Gradient von 100 mM zu 1000 mM KCl gefahren. Es wurden 40 Fraktionen je 1 ml gesammelt. Alle Lösungen wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetragen. Für die Herstellung des Gradienten wurden die Puffer BCE0 und BCE1000 mit pH<sub>4°C</sub> 7.6 eingesetzt.

In der weiteren Optimierung der FPLC-Aufreinigung wurden die Telomerase-haltigen Fraktionen des Gradienten gepoolt, mit 100 x Protease Inhibitor Mix M versetzt, und dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch mit MWCO 12.000-14.000 kDa nach Vorschrift des Herstellers vorbehandelt, der Pool in den Schlauch gegeben und über Nacht mit 2-3-fachem Wechsel des Dialysepuffers (BCE100 inkl. 0,5 mM DTT, pH<sub>4°C</sub> 8.6) dialysiert. Dieser Vorgang wurde im Kühlraum durchgeführt.

Das Dialysat wurde in Vivaspin 2 Hydrosart® Zentrifugationseinheiten mit einem MWCO von 30 kDa eingeeengt.

Die einzelnen Schritte wurden weiter optimiert :

- Die Beschallung der Proben wurde von 105 sec auf 150 sec (30 / 30 / 45 / 45 sec-Intervalle) erhöht, um einen noch besseren Aufschluss zu erzielen.
- Der lineare Gradient wurde durch einen Stufengradienten ersetzt. Hierzu wurde eine Anionenaustauscher-Zentrifugationseinheit (VivapureQ Maxi M Säule) und eine Kühlzentrifuge genutzt. Die Angaben des Herstellers wurden modifiziert, wobei die KCl-Konzentration und der pH-Wert der Puffer solange verändert wurden, bis die Telomerase in der 1000 mM-Fraktion eluiert wurde.
- Die Dialyse über Nacht wurde durch ein Umpuffern in einem Konzentrator (Amicon® Ultra-15 Zentrifugen Filtereinheiten, MWCO 100 kDa) ersetzt.
- Als letzte Änderung wurden die HL-60 Zellen als Telomerase-Quelle gegen HeLa-Zellkernextrakt ausgetauscht.

Mit den Erfahrungen aus den Optimierungsversuchen wurde das folgende Protokoll für die Aufreinigung der humanen Telomerase aus HeLa-Zellkernextrakt entwickelt.

#### 2.2.4.7 Optimierte Aufreinigung der Telomerase aus HeLa-Zellkernextrakt

1,764 ml HeLa-Zellkerextrakt, versetzt mit 17,64 µl 100 x Protease Inhibitor Mix M, wurden 1 h bei 4 °C und 100.000 x g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mit Puffer BCE10 (pH<sub>4°C</sub> 7.6) auf 19 ml aufgefüllt (Probe **L**), auf die äquilibrierte VivapureQ Maxi M Säule (Anionenaustauscher-Zentrifugationseinheit : AZ) gegeben, und in einer Hettich Universal 30 RF Zentrifuge bei 1800 x rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Durchlauf (**D1**) wurde erneut in die AZ gegeben und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte der Aufarbeitung wurden ebenfalls in der Zentrifuge von Hettich durchgeführt. Die AZ wurde bei 1800 x rpm und 4 °C gewaschen. Die Zentrifugationszeiten für die einzelnen Waschschrte, sowie die Puffer und Volumina der einzelnen Waschfraktionen sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Anzahl Waschschrte x Puffer	Volumen / Waschschrte	Zentrifugationszeit
1 x BCE10 (pH <sub>4°C</sub> 7.6)	10 ml	5 min
2 x BCE10 (pH <sub>4°C</sub> 8.9)	15 ml	5 min
3 x BCE100 (pH <sub>4°C</sub> 8.9)	5 ml	2 min
3 x BCE250 (pH <sub>4°C</sub> 8.9)	5 ml	2 min
3 x BCE450 (pH <sub>4°C</sub> 8.9)	5 ml	2 min
2 x BCE1000 (pH <sub>4°C</sub> 8.9)	5 ml	2 min
2 x BCE2000 (pH <sub>4°C</sub> 8.9)	5 ml	2 min

Die beiden BCE1000 (pH<sub>4°C</sub> 8.9) - Waschfraktionen wurden gepoolt, und in einer Amicon® Ultra-15 Zentrifugationseinheit (Konzentrator) mit MWCO 100 kDa umgepuffert. Zu diesem Zweck wurde der Pool in den mit Dialysepuffer (BCE100 inkl. 0,5 mM DTT, pH<sub>4°C</sub> 8.9) gespülten Konzentrator pipettiert, und bei 4800 x rpm und 4 °C bis zu einem Volumen von ≤ 200 µl eingengt. Der Konzentrator wurde mit kaltem Dialysepuffer auf 15 ml aufgefüllt, und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Das Konzentrat wurde mit 100 % Glycerin auf eine Endkonzentration von 20 % Glycerin eingestellt (Probe **K**), aliquotiert und

auf Trockeneis schockgefroren. Der Konzentrator wurde mit 3 ml Dialysepuffer versetzt, und die Lösung wurde eingeeengt. Die ankonzentrierte Lösung wurde mit 100 % Glycerin auf eine Endkonzentration von 20 % Glycerin eingestellt (Probe **S**), aliquotiert und auf Trockeneis schockgefroren. Proben **K** und **S** wurden bei – 80 °C gelagert.

#### 2.2.4.8 Immobilisierung der Telomerase an Heparin-Sepharose

30 µl Heparin-Sepharose wurden 3x mit 300 µl Puffer C<sub>100 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub> in einem Invisorb® Prefilter gewaschen. 300 µl (1:5)-Verdünnung des HeLa-Zellkernextrakts wurden durch die Heparin-Sepharose zentrifugiert. Dieser und alle nachfolgenden Schritte wurden in einer Eppendorf Zentrifuge 5402 bei 4 °C, 85 x g für 1 min durchgeführt. Der Durchlauf wurde in den Filter gegeben und durch die Heparin-Sepharose zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Es folgten 5 Waschschrte mit je 300 µl Puffer C<sub>100 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub> und weitere 4 Waschschrte mit je 100 µl Puffer C<sub>250 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub>. Die Heparin-Sepharose wurde 2x mit je 30 µl Puffer C<sub>100 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub> aufgeschwemmt und in ein Probenröhrchen überführt. Die Heparin-Sepharose und der Filter wurden mit je 37,5 µl 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

Reagens	(1:5)-Verdünnung
HeLa-Zellkernextrakt	140 µl
Puffer C <sub>250 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub>	224 µl
5 % CHAPS in Puffer C <sub>ohne KCl</sub>	19,04 µl
Puffer C <sub>ohne KCl</sub>	317 µl
0,25 M EDTA	0,448 µl
0,992 M MgCl <sub>2</sub>	0,212 µl
Endvolumen	700,7 µl

Reagens	C <sub>100 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub>	C <sub>250 mM KCl+0,2 % CHAPS</sub>
Puffer C <sub>2 M KCl</sub>	50 µl	125 µl
Puffer C <sub>ohne KCl</sub>	910 µl	835 µl
5 % CHAPS in Puffer C <sub>ohne KCl</sub>	40 µl	40 µl
Endvolumen	1000 µl	1000 µl

#### 2.2.4.9 Bindung der Telomerase an die NeutrAvidin™ Protein Plus Beads, beschichtet mit $\beta$ -20n/PS

Zu je 40  $\mu$ l NeutrAvidin™ Protein Plus Beads, die 2x mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen wurden, wurden je 195  $\mu$ l **Mix (Hyb.)** und 4,8  $\mu$ l 0,1 mM  $\beta$ -20n/PS bzw. 1 x TE-Puffer gegeben. Es folgte eine Inkubation im Thermomixer für 1 h, bei RT und 1000 x rpm. Die Beads wurden 4x mit je 200  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> und 1x mit 600  $\mu$ l Blockierpuffer in einem Invisorb® Prefilter gewaschen. Dann wurden sie mit 200-600  $\mu$ l Blockierpuffer in ein Probenröhrchen überführt, mit 2,4  $\mu$ l Poly(A)-RNA (25  $\mu$ g/ $\mu$ l) versetzt, und 30-40 min bei 30-32 °C im Thermomixer inkubiert. Nach der Blockierung wurden die Beads mit 600  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen. Die Waschschrte zur Beads-Vorbereitung wurden in einer Eppendorf miniSpin Zentrifuge bei RT und 1000 x rpm für 1 min durchgeführt. Zu den Beads wurden je 200  $\mu$ l der Probe HeLa+Mix (Bind.), welche aus 9,6  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt und 190,4  $\mu$ l **Mix (Bind.)** bestand, zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 31-32 °C und 1000 x rpm im Thermomixer und dann für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Anschließend wurde der Überstand von den Beads getrennt und analysiert.

Reagens	A <sub>100 mM KCl</sub>	Mix (Hyb.)	A <sub>100 mM KCl+0,5%TX</sub>
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	50 $\mu$ l	9,97 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	950 $\mu$ l	185,03 $\mu$ l	945 $\mu$ l
Triton-X 100 (100 %)	—	—	5 $\mu$ l
Endvolumen	1000 $\mu$ l	195 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

Reagens	Blockierpuffer	Mix (Bind.)
Puffer A <sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub>	—	991 $\mu$ l
25 $\mu$ g/ $\mu$ l Poly(A)-RNA	—	6,28 $\mu$ l
2 mg/ml Lachs Sperma DNA	—	2,84 $\mu$ l
10 mg/ml Lachs Sperma DNA	39,9 $\mu$ l	—
80 mg/ml BSA in Puffer A <sub>100 mM KCl</sub>	12,48 $\mu$ l	—
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	49,25 $\mu$ l	—
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	898,4 $\mu$ l	—
Endvolumen	1000 $\mu$ l	1000,1 $\mu$ l

2.2.4.10 Optimierte Bindung der Telomerase an NeutrAvidin™ Protein Plus Beads, beschichtet mit  $\beta$ -20n/PS

Je 45  $\mu$ l NeutrAvidin™ Protein Plus Beads wurden 2x mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen und mit 5,5  $\mu$ l 0,1 mM  $\beta$ -20n/PS bzw. 1 x TE-Puffer und 194,5  $\mu$ l **Mix (Hyb.)** versetzt. Nach einer Inkubation bei RT für 1 h im Thermomixer bei 1000 x rpm, wurden die Beads in ein Spincolumn mit Schraub- oder Schnappdeckel überführt, und 4x mit je 400  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und 1x mit 600  $\mu$ l Blockierpuffer gewaschen. 200  $\mu$ l Blockierpuffer und 2,4  $\mu$ l Poly(A)-RNA (25  $\mu$ g/ $\mu$ l) wurden zugegeben und die Spincolumns 25 min bei 30-33 °C im Thermomixer inkubiert. Nach der Blockierung wurden sie mit 600  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen. Die Waschschrte zur Beads-Vorbereitung wurden in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge bei RT und 1000 x rpm für 1 min durchgeführt. Zu den Beads wurden je 200  $\mu$ l der Probe HeLa+Mix (Bind.), welche aus 9,6  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt und 190,4  $\mu$ l **Mix (Bind.)** bestand, zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 31-33 °C und 1000 x rpm im Thermomixer und dann für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Nach der Inkubation wurden die Beads 4x mit je 400  $\mu$ l Puffer A<sub>100 / 300 / 600 / 1000 / 2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen. Die Waschschrte wurden in einer Eppendorf Zentrifuge 5402 für 1 min bei 4 °C und 1000 x rpm durchgeführt.

Reagens	Mix (Hyb.)	Blockierpuffer	Mix (Bind.)	A <sub>100 mM KCl+0,5%TX</sub>
Puffer A <sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub>	—	—	993 $\mu$ l	—
25 $\mu$ g/ $\mu$ l Poly(A)-RNA	—	—	6,3 $\mu$ l	—
Triton-X 100 (100 %)	—	5 $\mu$ l	—	5 $\mu$ l
10 mg/ml Lachs Sperma DNA	—	39,9 $\mu$ l	0,57 $\mu$ l	—
80 mg/ml BSA in Puffer A <sub>100 mM KCl</sub>	—	12,5 $\mu$ l	—	—
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	10,14 $\mu$ l	49,25 $\mu$ l	—	50 $\mu$ l
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	184,36 $\mu$ l	893,5 $\mu$ l	—	945 $\mu$ l
Endvolumen	194,5 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

Reagens	A <sub>300 mM KCl+0,5%TX</sub>	A <sub>600 mM KCl+0,5%TX</sub>	A <sub>1000 mM KCl+0,5%TX</sub>	A <sub>2000 mM KCl+0,5%TX</sub>
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	150 $\mu$ l	300 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	845 $\mu$ l	695 $\mu$ l	495 $\mu$ l	—
Triton-X 100 (100 %)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Endvolumen	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1005 $\mu$ l



2.2.4.11 Bindung der Telomerase an die NeutrAvidin™ Protein Plus Beads, beschichtet mit  $\beta$ -20n/PS, unter 1 M KCl

**Vorinkubation** : Je 90  $\mu$ l NeutrAvidin™ Protein Plus Beads wurden in ein Spincolumn mit Schnappdeckel überführt und 1x mit je 600  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und Blockierpuffer **1** gewaschen. Die Beads wurden in 200  $\mu$ l Blockierpuffer **1** aufgenommen und 30 min bei RT und 1000 x rpm im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie 1x mit 600  $\mu$ l Puffer A<sub>1000 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen und mit 200  $\mu$ l Jurkat+Mix (Bind.) versetzt. Das Spincolumn wurde 10 min bei 1000 x rpm und 27-32 °C inkubiert und nachfolgend 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 1000 x rpm für 1 min in einer Eppendorf 5402 Zentrifuge. Der Durchlauf (**D1**) wurde mit 2,4  $\mu$ l Poly(A)-RNA (25  $\mu$ g/ $\mu$ l) und 0,88  $\mu$ l Lachs Sperma DNA (1 mg/ml) versetzt. Diese Lösung entsprach **D1\*** und wurde in der Inkubation eingesetzt.

**Inkubation** : Je 67,5  $\mu$ l NeutrAvidin™ Protein Plus Beads wurden 2x mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen und mit 8,25  $\mu$ l 0,1 mM  $\beta$ -20n/PS und 192  $\mu$ l **Mix (Hyb.)** versetzt. Es folgte eine Inkubation im Thermomixer für 1 h, bei RT und 1000 x rpm. Die Beads wurden in ein Spincolumn mit Schraubdeckel überführt und 4x mit je 400  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und 1x mit 600  $\mu$ l Blockierpuffer **2a** gewaschen. Die Waschschrte zur Beads-Vorbeitung wurden im Inkubations- sowie im Vorinkubationsschritt in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge bei RT und 1000 x rpm für 1 min durchgeführt. Die Beads wurden anschließend in 200  $\mu$ l Blockierpuffer **2a** aufgenommen und 2,4  $\mu$ l Poly(A)-RNA (25  $\mu$ g/ $\mu$ l) wurden zugegeben. Diese Lösung (Blockierpuffer **2a** + Poly(A)-RNA) entsprach Blockierpuffer **2**. Nach einer Inkubation von 30 min bei 1000 x rpm und RT im Thermomixer, wurden sie 1x mit 600  $\mu$ l Puffer A<sub>1000 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen und in dem Durchlauf der Vorinkubation **D1\*** aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 1000 x rpm, 31 °C für 10 min im Thermomixer und dann für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Anschließend wurden die Beads 2x mit je 400  $\mu$ l Puffer A<sub>1000 mM KCl+0,5 % TX</sub>, 4x mit je 400  $\mu$ l Puffer A<sub>2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> und anschließend 2x mit je 400  $\mu$ l 1 x TE-Puffer gewaschen. Bei den TE-Waschschrten wurde nach Zugabe des Puffers 1 min bei RT inkubiert. Die Waschschrte wurden in einer Eppendorf Zentrifuge 5402 für 1 min bei 4 °C und 1000 x rpm durchgeführt.

Für die Zusammensetzung von Puffer A<sub>100 /1000 / 2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> S. **2.2.4.10**.

Reagens	Mix (Hyb.)	Jurkat + Mix (Bind.)	Blockierpuffer 1	Blockierpuffer 2a
Jurkat-Lysat ( $5 \times 10^4$ Zellen/ $\mu$ l)	—	10 $\mu$ l	—	—
Puffer A <sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub>	—	—	—	—
25 $\mu$ g/ $\mu$ l Poly(A)-RNA	—	—	—	—
Triton-X 100 (100 %)	—	—	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10 mg/ml Lachs Sperma DNA	—	—	—	39,9 $\mu$ l
80 mg/ml BSA in Puffer A <sub>100 mM KCl</sub>	—	—	12,5 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l	49,25 $\mu$ l	49,25 $\mu$ l
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	182 $\mu$ l	90 $\mu$ l	933,3 $\mu$ l	893,4 $\mu$ l
Endvolumen	192 $\mu$ l	200 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

#### 2.2.4.12 Assay zum Nachweis der humanen Telomerase (Telomerase-Assay)

Zu je 40  $\mu$ l NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads*, die 2x mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen wurden, wurden je 195  $\mu$ l **Mix (Hyb.)** und 4,8  $\mu$ l 0,1 mM  $\beta$ -20n/PS bzw. 1 x TE-Puffer gegeben. Es folgte eine Inkubation im Thermomixer für 1 h bei RT und 1000 x rpm. Die *Beads* wurden 4x mit je 200  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> und 1x mit 600  $\mu$ l Blockierpuffer in einem Invisorb® Prefilter gewaschen. Sie wurden mit 200  $\mu$ l Blockierpuffer in ein Probenröhrchen überführt, mit 2,4  $\mu$ l Poly(A)-RNA (25  $\mu$ g/ $\mu$ l) versetzt, und 30 min bei 32 °C im Thermomixer inkubiert. Nach der Blockierung wurden sie mit 600  $\mu$ l Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen. Die Waschschrte zur *Beads*-Vorbereitung wurden in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge bei RT und 1000 x rpm für 1 min durchgeführt. Zu den *Beads* wurden je 200  $\mu$ l der Probe HeLa+ Mix (Bind.), welche aus 9,6  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt und 190,4  $\mu$ l **Mix (Bind.)** bestand, zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 32 °C und 1000 x rpm im Thermomixer und dann für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Die *Beads* wurden in einen Invisorb® Prefilter überführt und 4x mit je 400  $\mu$ l Puffer A<sub>100 / 300 / 600 mM KCl+0,5 % TX</sub> und 1 x TE-Puffer gewaschen. Bei den TE-Waschschrten wurde nach Zugabe des Puffers 1 min bei RT inkubiert. Die Waschschrte wurden in einer Eppendorf Zentrifuge 5402 für 1 min bei 4 °C und 1000 x rpm durchgeführt. Nach dem letzten Waschrte wurde aus den *Beads* wie in 2.2.1.4 beschrieben, RNA isoliert.

**Mix (Hyb.), Mix (Bind.),** Puffer A<sub>100 mM KCl</sub>, der Blockierpuffer und Probe HeLa+ Mix (Bind.) hatten dieselbe Zusammensetzung wie in 2.2.4.9. Für Puffer A<sub>100 / 300 / 600 mM KCl+0,5 % TX</sub> S. 2.2.4.10.

#### 2.2.4.13 Telomerase-Assay mit neuen Versuchsbedingungen

Die Waschschritte zur *Beads*-Vorbeitung wurden im Inkubations- sowie im Vorinkubationsschritt in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge bei RT und 1000 x rpm für 1 min durchgeführt.

**Vorinkubation** : 90 µl NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads* wurden in ein Spincolumn mit Schnappdeckel überführt und 1x mit je 600 µl Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und Blockierpuffer **1** gewaschen. Die *Beads* wurden in 200 µl Blockierpuffer **1** aufgenommen und 30 min bei RT und 1000 x rpm im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie 1x mit 600 µl Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen und mit 200 µl Jurkat+Mix (Bind.), welche 64 µl Jurkat-Lysat und 136 µl **Mix (Bind.)** enthielt, versetzt. Das Spincolumn wurde 10 min bei 1000 x rpm und 30 °C inkubiert und dann 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 1000 x rpm für 1 min in einer Eppendorf 5402 Zentrifuge. Der Durchlauf (**D1**) wurde mit 1,2 µl Poly(A)-RNA (25 µg/µl) und 0,11 µl Lachs Sperma DNA (10 mg/ml) versetzt. Diese Lösung entsprach **D1\*** und wurde in der Inkubation eingesetzt. Die *Beads* wurden 2x mit je 400 µl Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub>, 4x mit je 400 µl Puffer A<sub>2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> und anschließend 2x mit je 400 µl 1 x TE-Puffer gewaschen. Bei den TE-Waschschritten wurde nach Zugabe des Puffers 1 min bei RT inkubiert \*\*. Die Waschschritte wurden in einer Eppendorf Zentrifuge 5402 für 1 min bei 4 °C und 1000 x rpm durchgeführt.

**Inkubation** : 67,5 µl NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads* wurden 2x mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen und mit 8,25 µl 1 x TE-Puffer und 192 µl **Mix (Hyb.)** versetzt. Es folgte eine Inkubation im Thermomixer für 1 h, bei RT und 1000 x rpm. Die *Beads* wurden in ein Spincolumn mit Schraubdeckel überführt und 4x mit 400 µl Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und 1x mit 600 µl Blockierpuffer **2a** gewaschen. Dann wurden sie in 200 µl Blockierpuffer **2a** resuspendiert und 2,4 µl Poly(A)-RNA (25 µg/µl) wurden zugegeben. Diese Lösung (Blockierpuffer **2a** + Poly(A)-RNA) entsprach Blockierpuffer **2**. Die *Beads* wurden 30 min bei 1000 x rpm und 33 °C im Thermomixer geblockt, dann mit 600 µl Puffer

A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen und in 150 µl **D1\*** resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 33 °C und 1000 x rpm im Thermomixer, folgte eine für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Anschließend wurden die *Beads* wie in der Vorinkubation (\*\*) gewaschen.

Aus den *Beads* der Vorinkubation und Inkubation wurde wie in 2.2.1.4 beschrieben, RNA isoliert.

Für die Zusammensetzung von **Mix (Hyb.)**, Puffer A<sub>100 /1000 / 2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> und den Blockierpuffern s. 2.2.4.11. Es wurde das Jurkat-Lysat, hergestellt mit CHAPS-Lysispuffer und einer Konzentration von 5x10<sup>4</sup> Zellen/µl, eingesetzt.

Reagens	Mix (Bind.)
Triton-X 100 (100 %)	1 µl
Puffer A <sub>2 M KCl</sub>	10 µl
Puffer A <sub>ohne KCl</sub>	125 µl
Endvolumen	136 µl

#### 2.2.4.14 Endversion des Telomerase-Assays

Die Bedingungen zum Blockieren der *Beads* in 2.2.4.8 – 14 wurden der Publikation von McPherson et al.[220] entnommen und modifiziert.

Die Waschschritte zur *Beads*-Vorbeitung wurden im Inkubations- sowie im Vorinkubationsschritt in einer Eppendorf *miniSpin* Zentrifuge bei RT und 1000 x rpm für 1 min durchgeführt.

**Vorinkubation** : 90 µl NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads* wurden in ein Spincolumn mit Schnappdeckel überführt und 1x mit je 600 µl Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und Blockierpuffer 1 gewaschen. Die *Beads* wurden in je 200 µl Blockierpuffer 1 aufgenommen und 30 min bei RT und 1000 x rpm im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie 1x mit 600 µl Puffer A<sub>1000 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen und mit 200 µl Jurkat+Mix (Bind.) versetzt. Die Spincolumns wurden 10 min bei 1000 x rpm und 27-32 °C inkubiert und dann 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 1000 x rpm für 1 min in einer Eppendorf 5402 Zentrifuge. Der Durchlauf (**D1**) wurde mit 2,4 µl Poly(A)-RNA (25 µg/µl) und 0,88 µl Lachs Sperma DNA (1 mg/ml) versetzt. Diese Lösung entsprach **D1\*** und wurde in der Inkubation eingesetzt.

**Inkubation**: 67,5 µl NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads* wurden 2x mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub> gewaschen und mit je 8,25 µl 0,1 mM β-20n/PS bzw. 1 x TE-Puffer und 192 µl **Mix (Hyb.)** versetzt. Es folgte eine Inkubation im Thermomixer für 1 h, bei RT und 1000 x rpm. Die *Beads* wurden in Spincolumns mit Schraubdeckel überführt und 4x mit 400 µl Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5 % TX</sub> und 1x mit 600 µl Blockierpuffer **2a** gewaschen. Dann wurden sie in 200 µl Blockierpuffer **2a** resuspendiert und 2,4 µl Poly(A)-RNA (25 µg/µl) wurden zugegeben. Diese Lösung (Blockierpuffer **2a** + Poly(A)-RNA) entsprach Blockierpuffer **2**. Die *Beads* wurden 30 min bei 1000 x rpm und 30-33 °C im Thermomixer geblockt, dann mit 600 µl Puffer A<sub>1000 mM KCl+0,5 % TX</sub> gewaschen und in der Lösung **D1\*** resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 31-33 °C und 1000 x rpm im Thermomixer, folgte eine für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Anschließend wurden die *Beads* 2x mit je 400 µl Puffer A<sub>1000 mM KCl+0,5 % TX</sub>, 4x mit je 400 µl Puffer A<sub>2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> und anschließend 2x mit je 400 µl 1 x TE-Puffer gewaschen. Bei den TE-Waschschritten wurde nach Zugabe des Puffers 1 min bei RT inkubiert. Die Waschschritte wurden in einer Eppendorf Zentrifuge 5402 für 1 min bei 4 °C und 1000 x rpm durchgeführt.

Aus den *Beads* der Inkubation wurde wie in **2.2.1.4** beschrieben, RNA isoliert.

Für die Zusammensetzung von **Mix (Hyb.)**, Puffer A<sub>100 /1000 / 2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> und den Blockierpuffern s. **2.2.4.11**. Es wurde das Jurkat- bzw. HUVEC-Lysat, hergestellt mit Triton-X 100-haltigem-Lysispuffer, eingesetzt. Die Probe Jurkat/HUVEC+Mix (Bind.) enthielt das entsprechende Lysat, Puffer A<sub>2000 mM KCl+0,5 % TX</sub> und A<sub>ohne KCl+0,5 % TX</sub>, so dass die Endkonzentration des KCl 1000 mM war.

Bei einem Teil der Inkubationen bei RT im Thermomixer, beschrieben in den Versuchen in **2.2.4.9-2.2.4.14**, wurde während der Inkubationszeit eine Temperaturerhöhung beobachtet.

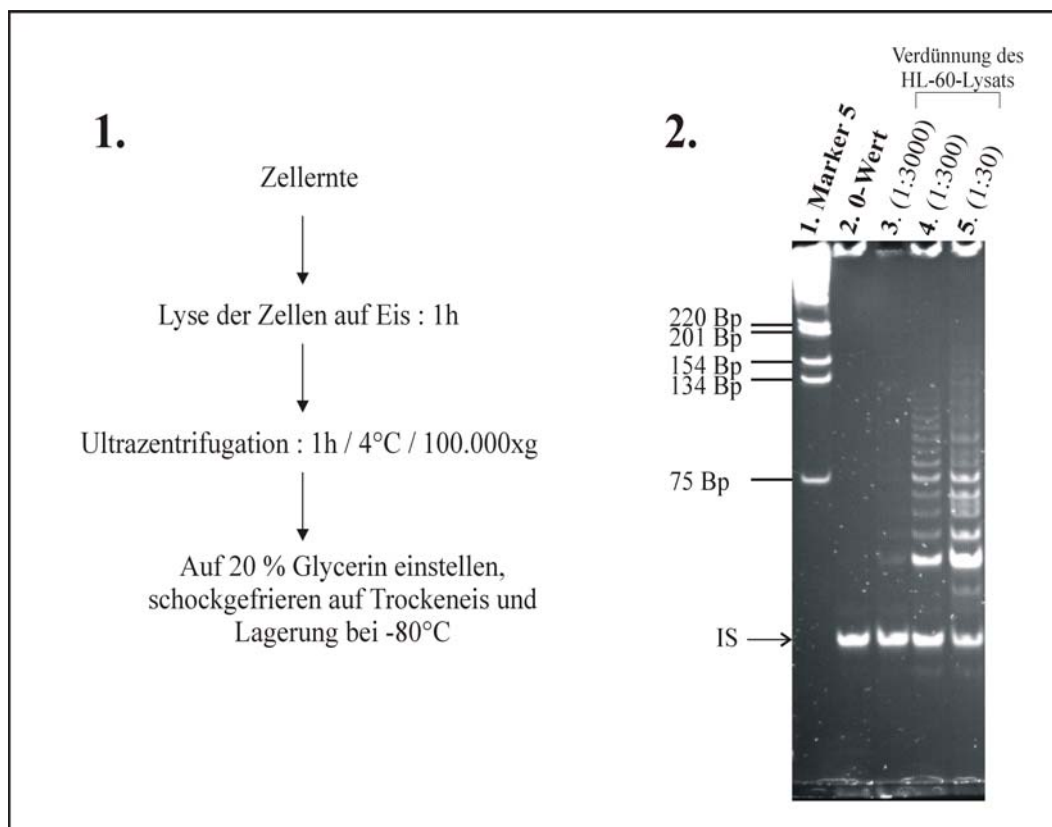
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wahl der Telomerase-Quelle für die Entwicklung des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase

Es wurde eine Telomerase-Quelle für die Optimierung des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase gesucht, die leicht zugänglich ist und eine hohe Telomerase-Aktivität besitzt.

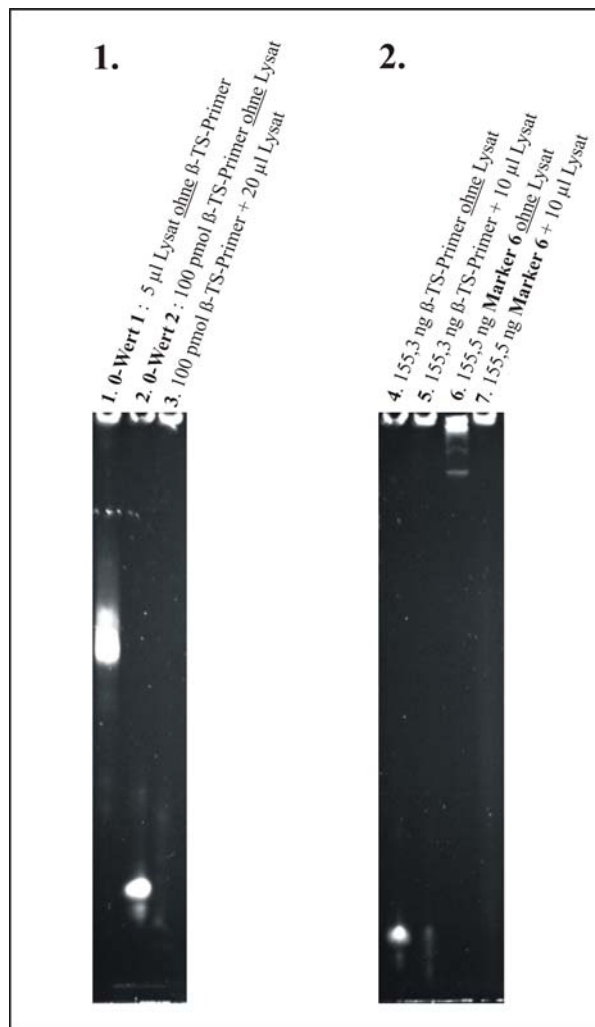
##### 3.1.1 $\ddot{U}_{100}$ -Lysate

Die erste Telomerase-Quelle, welche getestet werden sollte, war ein Lysat aus den Telomerase-reichen HL-60 Zellen. Es wurde ein konzentriertes Lysat aus  $10,6-12,1 \times 10^7$  Zellen hergestellt. In **Abb. 9** ist die Lysatherstellung schematisch gezeigt. Das Lysat wurde im TRAP-Assay getestet.



**Abb. 9:** 1.: Schematische Darstellung der Lysatherstellung. 2.: TRAP-Assay mit dem hergestellten Lysat. Je 2  $\mu$ l einer (1:30)/(1:300)/(1:3000)-Verdünnung des Lysats mit CHAPS-Puffer wurde in dem TRAP-Assay eingesetzt. Der 0-Wert enthält 2  $\mu$ l CHAPS-Puffer. Die ganzen Ansätze (25  $\mu$ l) wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Das hergestellte Lysat sollte auch in einem direkten Telomerase-Assay, in welchem die von der Telomerase verlängerten TS-Primer nachgewiesen werden, getestet werden. In diesem Assay wurde wie im TRAP-Assay, ein 5'-biotinylierter TS-Primer ( $\beta$ -TS) als Substrat für die Telomerase eingesetzt. Im direkten Assay wurden unterschiedliche Mengen des Lysats eingesetzt. Es konnte kein Telomerase-Produkt detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass der Nachweis mittels Fluoreszenz-Färbung des Polyacrylamidgels nicht empfindlich genug ist. Um unter diesen Bedingungen die Einzelstränge zu sehen wäre dann eine viel empfindlichere Methode, wie z.B. die radioaktive Markierung, notwendig. Ein andere Ursache dafür könnte die Anwesenheit von DNasen, die den  $\beta$ -TS-Primer und eventuell entstandene Telomerase-Produkte abbauen, sein. Dies wurde durch die Beobachtung, dass bei den großen Lysat-Mengen ein fast vollständiger Abbau des  $\beta$ -TS-Primers stattfand, bestätigt (s. **Abb. 10-1.**). Im **0-Wert 1** des direkten Telomerase-Assays (**Spur 1. in 1.**) wurde ein sehr starkes Signal detektiert, welches auf RNA aus dem Lysat, zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurden in dem direkten Assay die Proben nach der Telomerase-Reaktion mit RNase verdaut, da sonst keine Analyse möglich gewesen wäre (**Spur 2. und 3. in 1.**). Das Lysat wurde auf DNasen-Anwesenheit getestet. Es wurde ein doppelsträngiges Substrat (Marker 6) sowie ein einzelsträngiges ( $\beta$ -TS-Primer) mit dem Lysat inkubiert und nachträglich mit RNase verdaut. In beiden Fällen wurde ein Abbau der Substrate beobachtet. In **Abb. 10-2.** sind diese Ergebnisse gezeigt.



**Abb. 10:** 1.: Direkter Telomerase-Assay mit HL-60-Lysat. 2.: Test des hergestellten HL-60-Lysats auf DNasen. Je 40 µl des direkten Telomerase-Assays sowie der DNase-Test-Ansätze wurden auf ein denaturierendes 10 %-iges (7 M Urea) aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

In den konzentrierten Lysaten mit hoher Telomerase-Aktivität wurde DNase-Aktivität gefunden. Sie waren als Telomerase-Quelle für ein Oligonukleotid-Ligations-Assay nicht geeignet, da die vorhandenen DNasen die beiden Ligationsprimer, welche DNA-Oligonukleotide sind, verdauen würden. Aus diesem Grund sollte die Telomerase aus HL-60 Zellen aufgereinigt werden, um die DNasen von der Telomerase-haltigen Fraktion zu trennen.

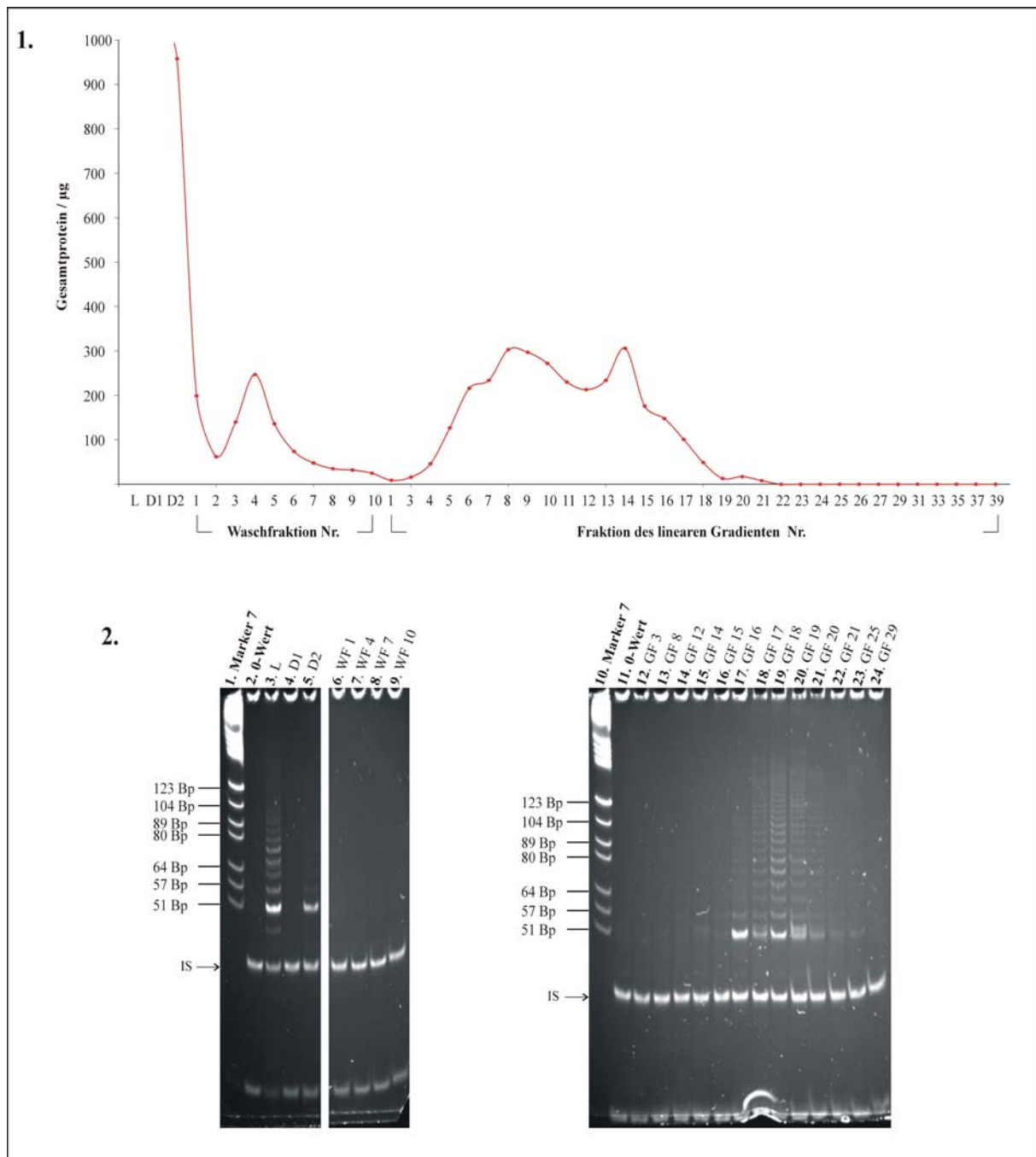


### 3.1.2 Aufreinigung der Telomerase

Als Grundlage für die Telomerase-Aufreinigung dienten die Veröffentlichungen von Yoshida et al. [221] und Pascolo et al. [217]. Yoshida et al. haben aus Etoposid-behandelten HL-60 Zellen, welche Apoptose erfahren, eine  $Mg^{2+}$ -abhängige Endonuklease-Aktivität (AN34) charakterisiert. In dem ersten Schritt der Aufreinigung wurde ein Zelllysats aus diesen Zellen bei pH 7.0 (0 mM KCl) über einen Ionenaustauscher (HiTrapQ-Sepharose : Anionenaustauscher) gegeben, und dann mit dem Auftragspuffer gewaschen. Der Durchlauf und die Waschfraktionen wurden gesammelt und analysiert. Die Nuklease-Aktivität wurde hauptsächlich in den Waschfraktionen gefunden.

Pascolo et al. haben Telomerase aus HeLa-Zellkernextrakt aufgereinigt. Das HeLa-Zellkernextrakt wurde in Puffer BCE100 (pH 8.0; 100 mM KCl) verdünnt und auf eine HiTrapQ HP-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Waschen mit dem Auftragspuffer wurde ein Stufengradient durchgeführt. Die Telomerase wurde bei 1000 mM KCl von der Säule eluiert, und die Telomerase-haltigen Fraktionen dann gegen BCE100 (inkl. 500  $\mu$ M DTT und 250  $\mu$ M PMSF) dialysiert.

Die beiden publizierten Aufreinigungen sollten kombiniert werden, um die Telomerase aus HL-60 Zellen zu reinigen. Als erstes sollte getestet werden, ob die Telomerase aus HL-60 Zellen bei pH<sub>4°C</sub> 7.6 mit einer Ionenaustauschchromatographie (FPLC) von der Hauptmasse der restlichen Proteine abgetrennt werden kann. Es wurden die Puffer von Pascolo et al. eingesetzt, jedoch nicht bei pH 8.0 sondern bei pH<sub>4°C</sub> 7.6. Die HL-60 Zellen wurden hier nicht wie bei Yoshida et al. mit Hilfe von TritonX-100 lysiert, sondern mit Ultraschall in BCE100 aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 100.000xg wurde der Überstand mit BCE100 verdünnt und zweimal auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen. Wie bei Pascolo et al. wurde dann mit BCE100 gewaschen, dann jedoch kein Stufengradient sondern ein linearer Gradient von 100-1000 mM KCl gefahren. Es wurden 40 Fraktionen je 1 ml gesammelt. Die Reinigung wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Waschfraktionen und die Gradienten-Fraktionen wurden wie in der Publikation auf Telomerase-Aktivität im TRAP-Assay und auf Proteingehalt mit Hilfe der Bradford-Proteinbestimmung analysiert. In **Abb. 11** sind die Ergebnisse gezeigt.



**Abb. 11:** Aufreinigung der Telomerase aus HL-60 Zellen. **1.:** Verteilung der Proteinmengen in den verschiedenen Fraktionen auf Basis der Bradford-Proteinbestimmung. Je 10 µl des Proteinstandards bzw. der getesteten Fraktionen wurden in der Bradford-Proteinbestimmung eingesetzt. Die Proben L (5,88 mg) und D1 (1,29 mg) lagen außerhalb der Skalierung. Die Probe L entsprach dem verdünnten 100.000xg Überstand, welcher auf die Säule aufgetragen wurde. **2.:** TRAP-Assay mit den verschiedenen Fraktionen. Jede Fraktion wurde (1:10) mit CHAPS-Puffer verdünnt und 2 µl dieser Verdünnung im TRAP-Assay eingesetzt. Der 0-Wert enthielt 2 µl CHAPS-Puffer. Als Substrat für die Telomerase wurde der β-TS-Primer benutzt. Die ganzen TRAP-Assay-Ansätze (25 µl) wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abkürzungen: **L** : Lysat, **D** : Durchlauf, **WF** : Waschfraktion Nr., **GF** : Gradientenfraktion Nr..

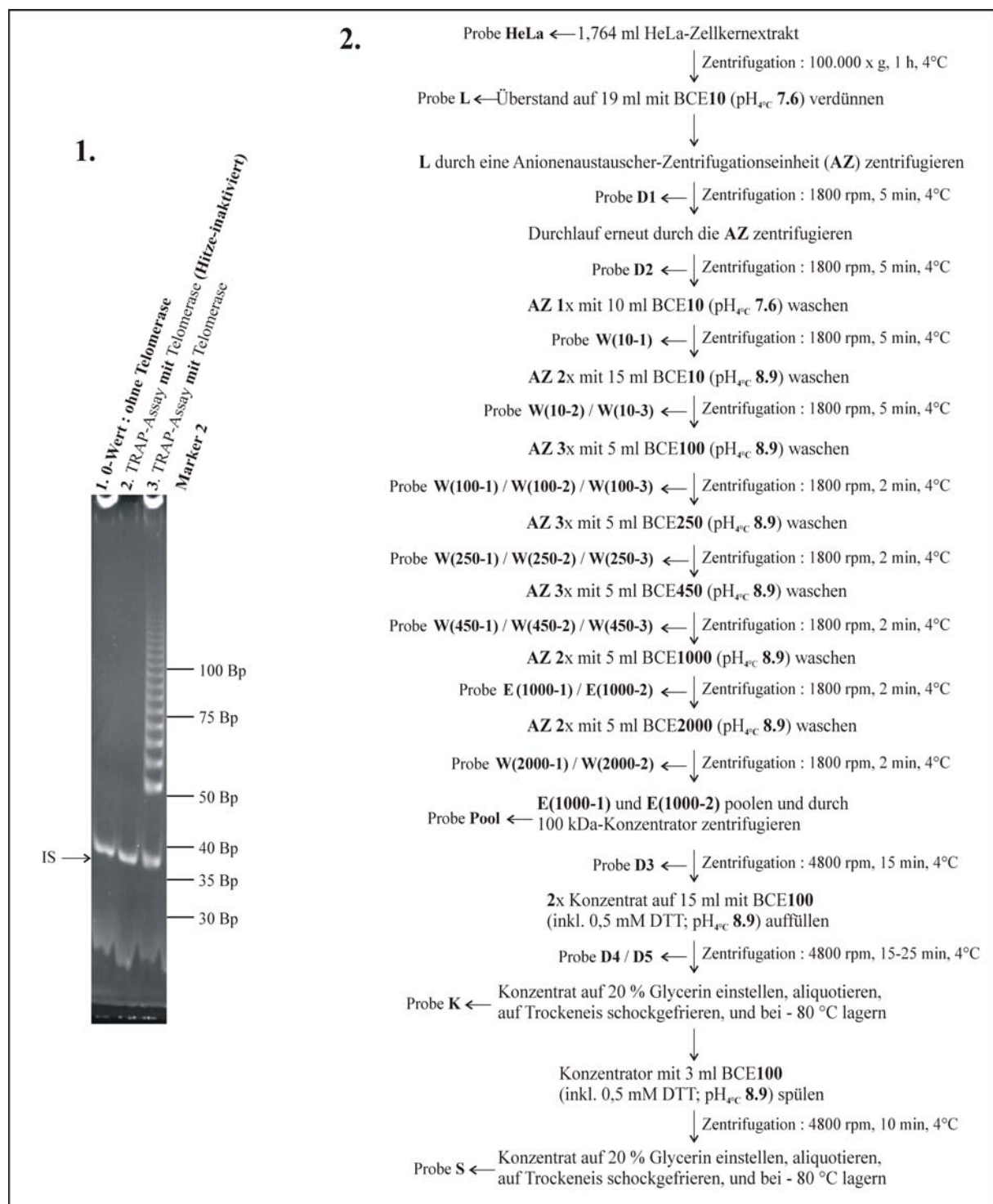
Die Telomerase wurde im linearen Gradienten mit 450-600 mM KCl eluiert. DNase-Aktivität wurde in dem Lysat, Durchläufen und einem Teil der Waschfraktionen detektiert.

Im nächsten Schritt der Aufreinigung wurden die Telomerase-haltigen Fraktionen gepoolt und über Nacht gegen BCE100 pH<sub>4°C</sub> 8.6 (inkl. 0,5 mM DTT) dialysiert. Das Dialysat wurde in Konzentratoren eingeeengt.

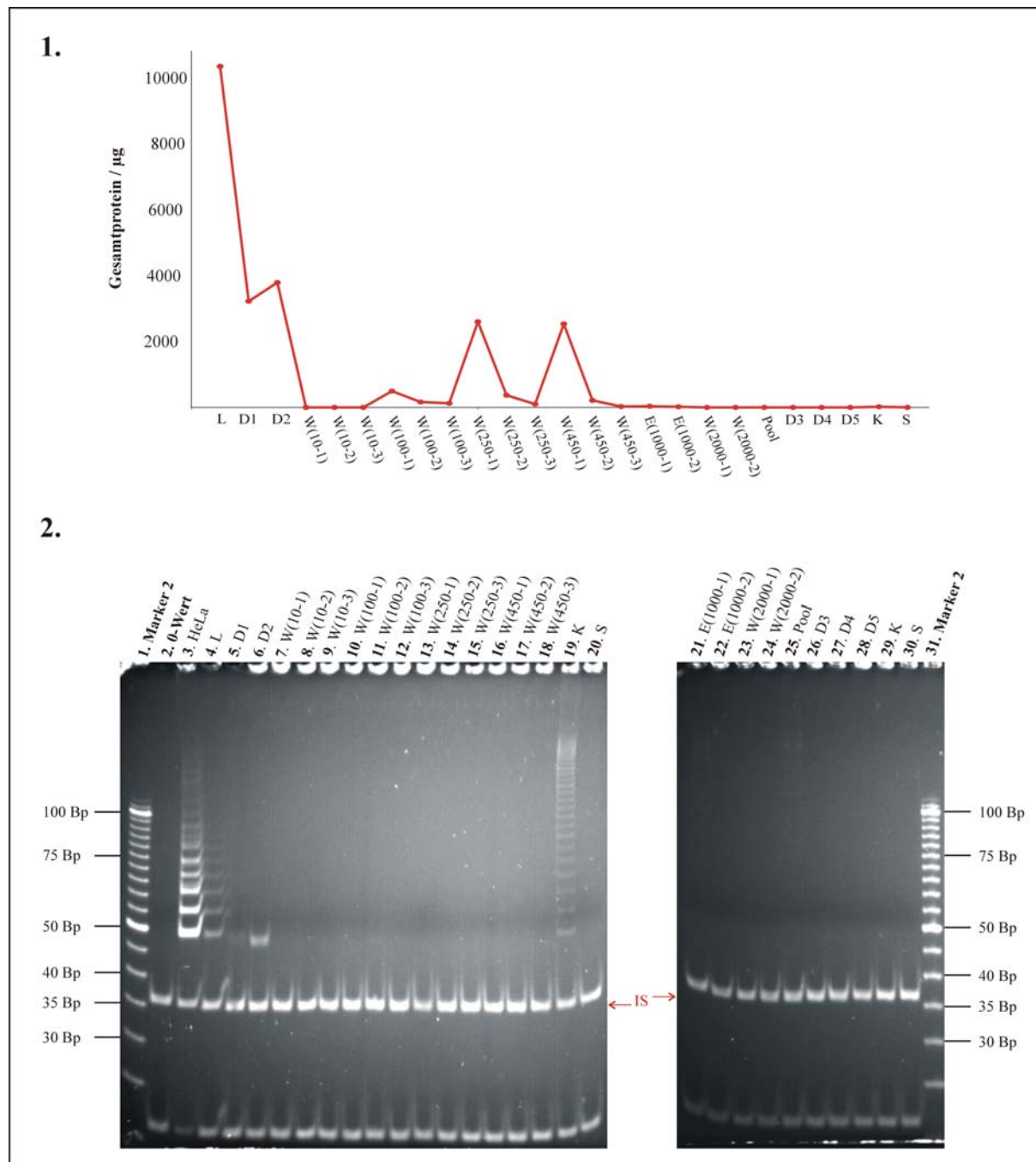
Die Aufreinigung wurde folgendermaßen optimiert :

- Die HL-60 Zellen als Telomerase-Quelle wurden durch HeLa-Zellkernextrakt, welches käuflich zu erwerben ist und eine hohe Proteinkonzentration aufweist (ca. 8,5 mg/ml laut Hersteller), ausgetauscht. Das HeLa-Zellkernextrakt wurde von demselben Hersteller bezogen wie bei Pascolo et al.. Ein weiterer Vorteil des HeLa-Zellkernextrakts war, dass es aus Zellkernen hergestellt wurde, und die zytosolischen Proteine schon bei der Herstellung abgetrennt wurden. Zudem wies es eine sehr hohe Telomerase-Aktivität auf (s. **1.** in **Abb. 12**).
- Die HiTrapQ-Säule und FPLC-Anlage wurden durch eine Anionenaustauscher-Zentrifugationseinheit ausgetauscht.
- Der lineare Gradient wurde durch einen Stufengradienten ersetzt. Die Bindung der Proteine und der erste Waschschrift blieben bei pH<sub>4°C</sub> 7.6, alle weiteren Wasch- und Elutionsschritte bzw. Umpuffern wurde jedoch bei pH<sub>4°C</sub> 8.9 durchgeführt.
- Die Dialyse im Dialyseschlauch über Nacht wurde durch ein Umpuffern in einem Konzentrator mit MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) 100 kDa ersetzt. In demselben Konzentrator wurde dann die umgepufferte Probe eingeeengt.

In **2.** in **Abb. 12** ist eine schematische Darstellung der optimierten Telomerase-Aufreinigung aus HeLa-Zellkernextrakt gezeigt, in **Abb. 13** die Ergebnisse dieser Aufreinigung.



**Abb. 12:** 1.: TRAP-Assay mit dem HeLa-Zellkernextrakt als Telomerase-Quelle. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurde 1 µl des HeLa-Zellkernextrakts eingesetzt. 1/400 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25 µl) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. 2.: Schematische Darstellung der Telomerase-Aufreinigung aus HeLa-Zellkernextrakt. BCE10-2000 enthielt entsprechend 10-2000 mM KCl. Abkürzungen: **L** : Lysat, **D** : Durchlauf, **W** : Waschfraktion, **E** : Eluat, **AZ** : Anionenaustauscher-Zentrifugationseinheit.



**Abb. 13:** Optimierte Telomerase-Aufreinigung aus HeLa-Zellkernextrakt. **1.:** Verteilung der Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen. Je 10 µl des Proteinstandards und der Fraktionen bzw. der (1:2)-Verdünnungen wurden in der Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. **2.:** TRAP-Assay. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Alle Proben wurden (1:10) mit CHAPS-Puffer verdünnt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden äquivalente Mengen zum Beladungsvolumen (L) von den (1:10)-verdünnten Fraktionen (Spur 3-18 und 21-30) bzw. 2 µl von der (1:10)-verdünnten Probe K und S (Spur 19-20) eingesetzt. 1/4 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25 µl) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach dem Ultrazentrifugations (UZ)-Schritt wurde eine starke Abnahme der Telomerase-Aktivität beobachtet. Die restliche Telomerase-Aktivität wurde in der 1000 mM-Fraktion eluiert. Durch die Optimierung wurde die Zeit für die Aufreinigung von 2 Tagen auf einen halben Tag reduziert.

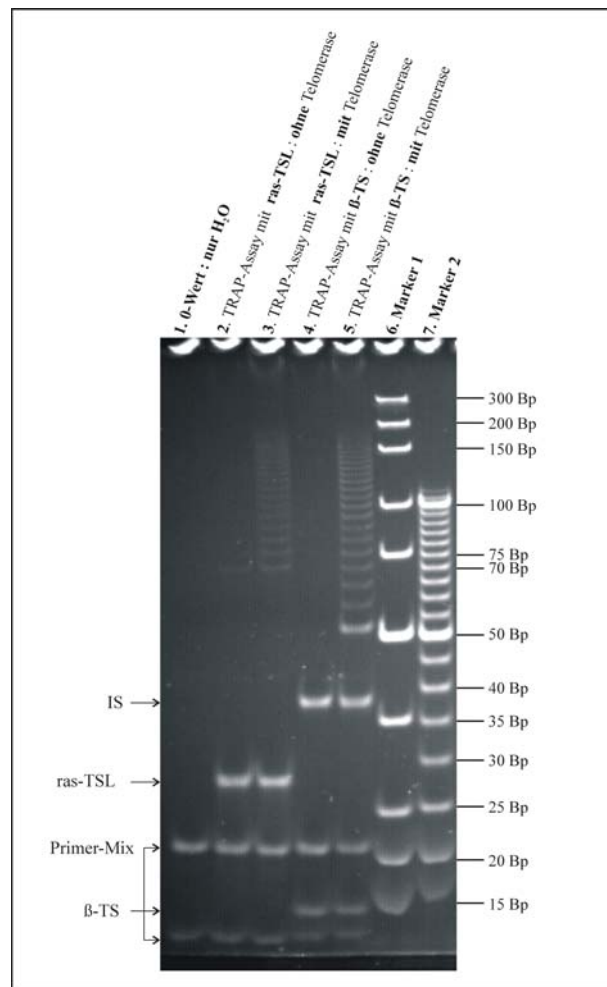
Es gelang, die Telomerase in einem schnellen Verfahren, bei dem sie von der Hauptmasse der restlichen Proteine abgetrennt wurde, aufzureinigen. Die umgepufferte und ankonzentrierte Telomerase-Fraktion wurde zur Optimierung des Oligonukleotid-Ligations-Assays eingesetzt.

## 3.2 Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA)

### 3.2.1 Test des ras-TSL als Substrat für die Telomerase

Um ein OLA mit dem ras-TSL als Akzeptor durchführen zu können, muss der ras-TSL seinen Bestimmungsort, d.h. die *anchor site* und die ersten 5 Basen der Template site der hTR finden. Um dies zu testen wurde mit dem ras-TSL als Substrat ein TRAP-Assay gestartet. Falls die *anchor site* und die ersten 5 Basen der Template site für den ras-TSL zugänglich sind, so muss er auch als Substrat für die Telomerase dienen können. Es wurde die aus HeLa-Zellkernextrakt aufgereinigte Telomerase eingesetzt. Der TRAP-Assay wurde zuerst mit einer normalen *Taq* DNA Polymerase gestartet, welche zusammen mit den restlichen Komponenten zugegeben wurde. Es entstanden nur PCR-Artefakte, welche eine Aussage unmöglich machten. Deshalb wurde der TRAP-Assay in zwei Reaktionen aufgeteilt : 1) Telomerase-Reaktion : der ras-TSL bzw. der  $\beta$ -TS-Primer wurden der aufgereinigten Telomerase als Substrat angeboten. In dieser Reaktion sollte die Telomerase die Substrat-Primer verlängern. 2) Nachfolgende Amplifikation der Telomerase-Produkte : die in 1) entstandenen Produkte sollten mit einer Hot Start *Taq* DNA Polymerase amplifiziert werden. Auf diese Weise sollten die unspezifischen Nebenprodukte unterdrückt werden.

In **Abb. 14** sind die Ergebnisse dieses TRAP-Assays dargestellt.



**Abb. 14:** TRAP-Assay mit ras-TSL bzw.  $\beta$ -TS-Primer, bei dem die Telomerase-Reaktion von der PCR getrennt wurde. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurde 1  $\mu$ l der aufgereinigten Telomerase eingesetzt. 1/16 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben. Je 15  $\mu$ l des gesamten PCR-Ansatzes (25  $\mu$ l) wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt. In Spur 1. ist der 0-Wert der PCR aufgetragen.

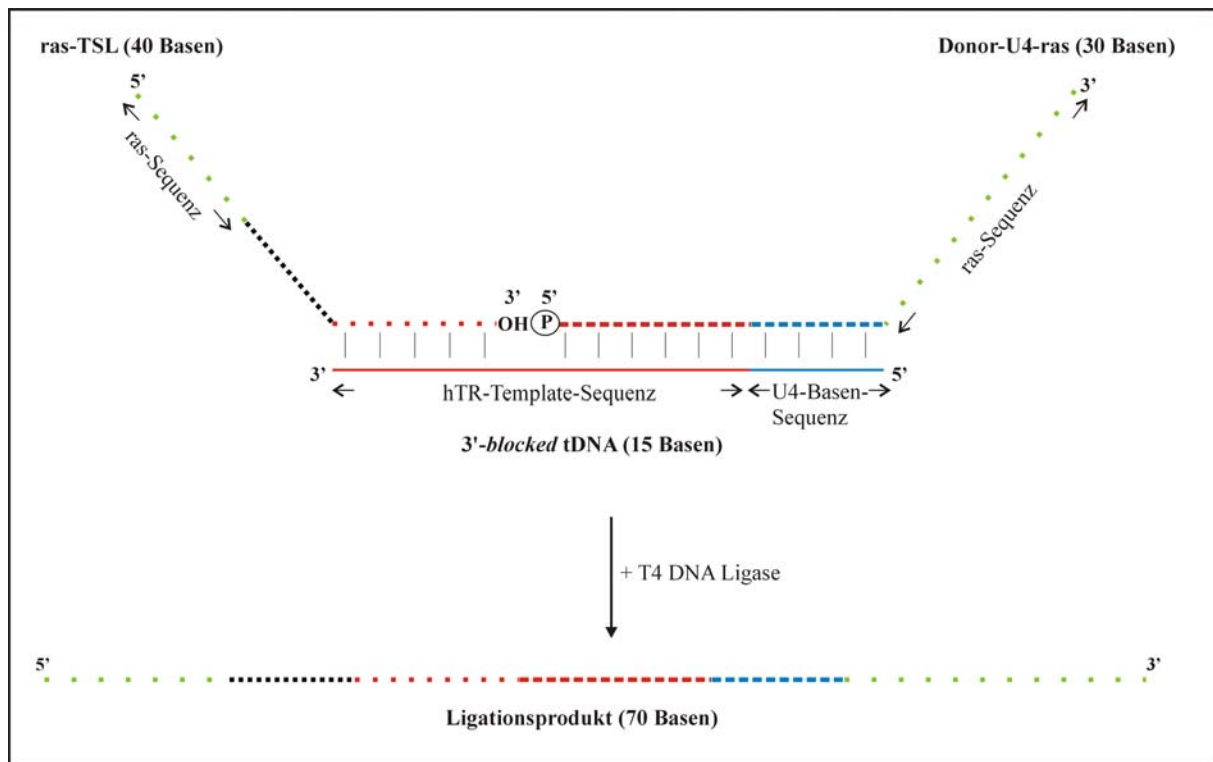
Die Telomerase nimmt den ras-TSL als Substrat an. Das erste nachweisbare Produkt hat eine Länge von 70 Bp, was daran liegt, dass der ras-TSL im Gegensatz zum TS-Primer eine 5'-terminale Verlängerung von 20 Basen hat. Die Bande, die auf derselben Höhe in der Telomerase-negativen Probe (s. Spur 2.) läuft, ist ein unspezifisches PCR-Produkt. In den Ansätzen mit dem  $\beta$ -TS Primer laufen die Banden etwas höher als die Produkte des TRAP-Assays mit dem nicht-biotinylierten TS-Primer. Dieses Laufverhalten liegt an der Biotinylierung. In den Proben mit dem ras-TSL als Substrat (Spur 2. und 3.) wird kein Interner Standard (IS) gebildet. Dies liegt daran, dass für die Amplifikation des IS der TS-Primer benötigt wird, und der ras-TSL 3'-terminal die TS-Primer-Sequenz, verlängert um

zwei Basen, trägt. Mit dieser Sequenz als vorwärts-Primer ist es wahrscheinlich nicht möglich den IS zu amplifizieren.

### **3.2.2 Ermittlung der Reaktionsbedingungen für den OLA mit Hilfe eines synthetischen Templates**

Der OLA wurde mit einer Positivkontrolle optimiert, um die Reaktionsbedingungen zu bestimmen. Diese stellte ein 3'-ddC-geblocktes Oligonukleotid (*3'-blocked* tDNA) dar, welches dieselbe Sequenz hat, wie die 15 zugänglichen Basen der hTR. Nur wurden hier aus Stabilitätsgründen DNA-Basen und nicht RNA-Basen verwendet. Das 3'-Ende wurde geblockt, damit es nicht an unspezifischen Ligations- sowie Verlängerungsreaktionen in der nachfolgenden ras-PCR teilnehmen kann. Die Ligation wurde für 3 h bei 4 °C durchgeführt, um eine gute Hybridisierung der kurzen Ligationsprimer mit dem Template zu gewährleisten. Das Versuchsschema ist in **Abb. 15** gezeigt. Es wurde eine Vorinkubation der *3'-blocked* tDNA mit dem ras-TSL-Ligationsprimer durchgeführt, da in dem OLA die beiden Ligationsprimer teilweise um dieselben Bindungsstellen konkurrieren könnten, wenn sie gleichzeitig zugegeben würden. Auf diese Weise sollten die Ligationspartner nacheinander ihre jeweilige Bindungsstelle besetzen. Es wurden unterschiedliche Verhältnisse der *3'-blocked* tDNA zum ras-TSL und Donor-U4-ras getestet um festzustellen, bei welchen Ligationsproduktbildung stattfindet. Bei den Versuchen wurden die Verhältnisse der Oligonukleotide untereinander konstant gehalten.



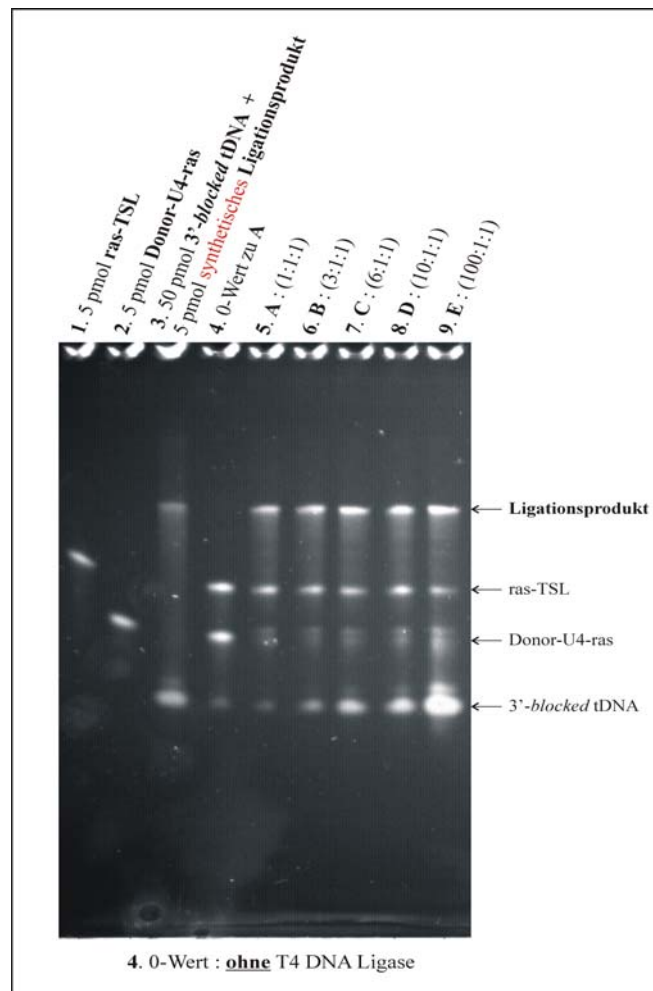


**Abb. 15:** Schematische Darstellung des OLAs mit der Positivkontrolle

Bei den Verhältnissen, bei welchen äquimolare Mengen oder ein Überschuss an *3'-blocked* tDNA gegenüber den Ligrationsprimern herrschten (s. **Tabelle 2**), schien die Ligationproduktbildung effektiver zu sein. In **Abb. 16** ist die Ligationproduktbildung bei diesen Verhältnissen gezeigt :

Verhältnis in 10 µl Ansatz	<i>3'-blocked</i> tDNA / pmol	ras-TSL / pmol	Donor-U4-ras / pmol
<b>0-Wert</b>	5	5	5
<b>A : (1 : 1 : 1)</b>	5	5	5
<b>B : (3 : 1 : 1)</b>	15	5	5
<b>C : (6 : 1 : 1)</b>	30	5	5
<b>D : (10 : 1 : 1)</b>	50	5	5
<b>E : (100 : 1 : 1)</b>	500	5	5

**Tabelle 2:** Getestete Verhältnisse im OLA in **Abb. 16**

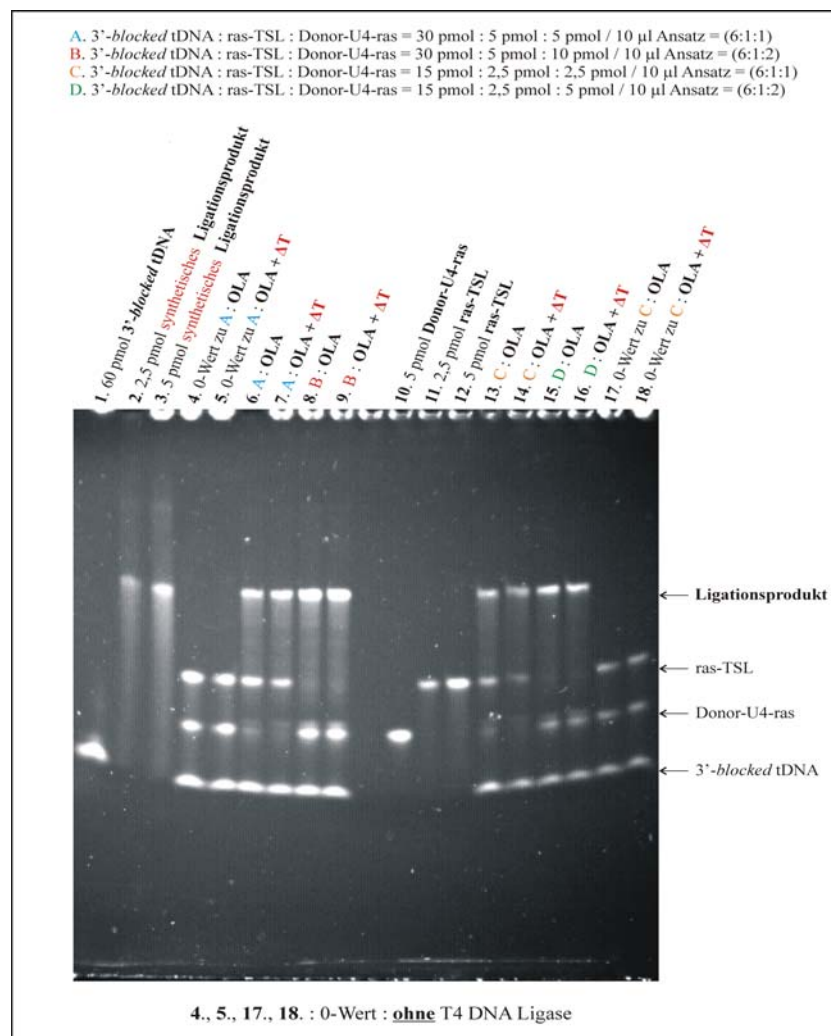


**Abb. 16:** Ligationsproduktbildung im OLA bei unterschiedlichen 3'-blocked tDNA : Ligationsprimer-Verhältnissen. Je 10 µl der OLA-Ansätze wurden auf einem denaturierenden 10 %-igen Polyacrylamidgel (7 M Urea) elektrophoretisch aufgetrennt.

Es wurde ein Oligonukleotid, welches die Sequenz des Ligationsprodukts besitzt (synthetisches Ligationsprodukt) als Längenstandard auf dem Gel (s. Spur 3.) mitgeführt. Das Ligationsprodukt wurde bei allen Verhältnissen gebildet, sowie in allen Ansätzen ein unvollständiges Reagieren des ras-TSL beobachtet wurde.

Um den nicht-reagierten ras-TSL umzusetzen, wurde ein „gecycelter“ OLA (OLA+**ΔT**) ausprobiert. Da der normale OLA bei 4°C stattfindet, kann die 3'-blocked tDNA nach der Ligationsproduktbildung nicht an einer weiteren Runde der Ligation teilnehmen ( $T_m$  des Ligationsprodukts wurde mit dem BioMath-Programm der Fa. Promega auf 36 °C berechnet). Deshalb wurden Ligations-Intervalle (10 min bei 4°C) mit kürzeren Erhitzungs-Intervallen (2 min bei 38°C) abgewechselt, in denen die entstandene Doppelhelix eventuell schmelzen

sollte, und diese Prozedur wurde 30 mal wiederholt. Zusätzlich würde diese Temperaturerhöhung ein Durchmischen der Probe bewirken. Es wurde 38°C gewählt, da die T4 DNA Ligase nicht thermostabil ist - schon bei 40°C verringert sich zeitabhängig ihre Aktivität [222]. Der OLA und der OLA+ $\Delta T$  wurden bei einem Verhältnis 3'-blocked tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras von (6:1:1) und (6:1:2) miteinander verglichen. Das Verhältnis von (6:1:2) wurde mitgeführt, um zu testen, ob ein Überschuss an Donor-U4-ras zur vollständigen Umsetzung des ras-TSL führen kann. Beide Methoden wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Oligonukleotiden durchgeführt, da bei kleineren Konzentrationen die Unterschiede besser zu sehen sein könnten. Die Ergebnisse sind in **Abb. 17** dargestellt.



**Abb. 17:** Vergleich von OLA mit OLA+ $\Delta T$  für die Positivkontrolle. Je 10  $\mu$ l der OLA- bzw. OLA+ $\Delta T$  Ansätze wurden auf einem denaturierenden 10 %-igen Polyacrylamidgel (7 M Urea) mittels Elektrophorese aufgetrennt.

Die Auswertung wurde mit dem Programm Image J [210] durchgeführt. Es wurde bei allen Ansätzen der OLA mit dem OLA+ $\Delta T$  verglichen. Als Ladekontrolle wurde die 3'-*blocked* tDNA benutzt, und die anderen Werte wurden auf diesen Wert normiert.

	Intensität der normierten Ligationsprodukte		Vergleich
	OLA	OLA+ $\Delta T$	OLA : OLA+ $\Delta T$
<b>A : (6:1:1)</b>	2225,9	2487,1	<b>1 : 1,12</b>
<b>B : (6:1:2)</b>	2978,2	3128,9	<b>1 : 1,05</b>
<b>C : (6:1:1)</b>	1121,2	1335,1	<b>1 : 1,19</b>
<b>D : (6:1:2)</b>	2024,3	2174,7	<b>1 : 1,07</b>

**Tabelle 3:** Vergleich der Ligationsproduktbildung bei den Verhältnissen aus **Abb. 17**.

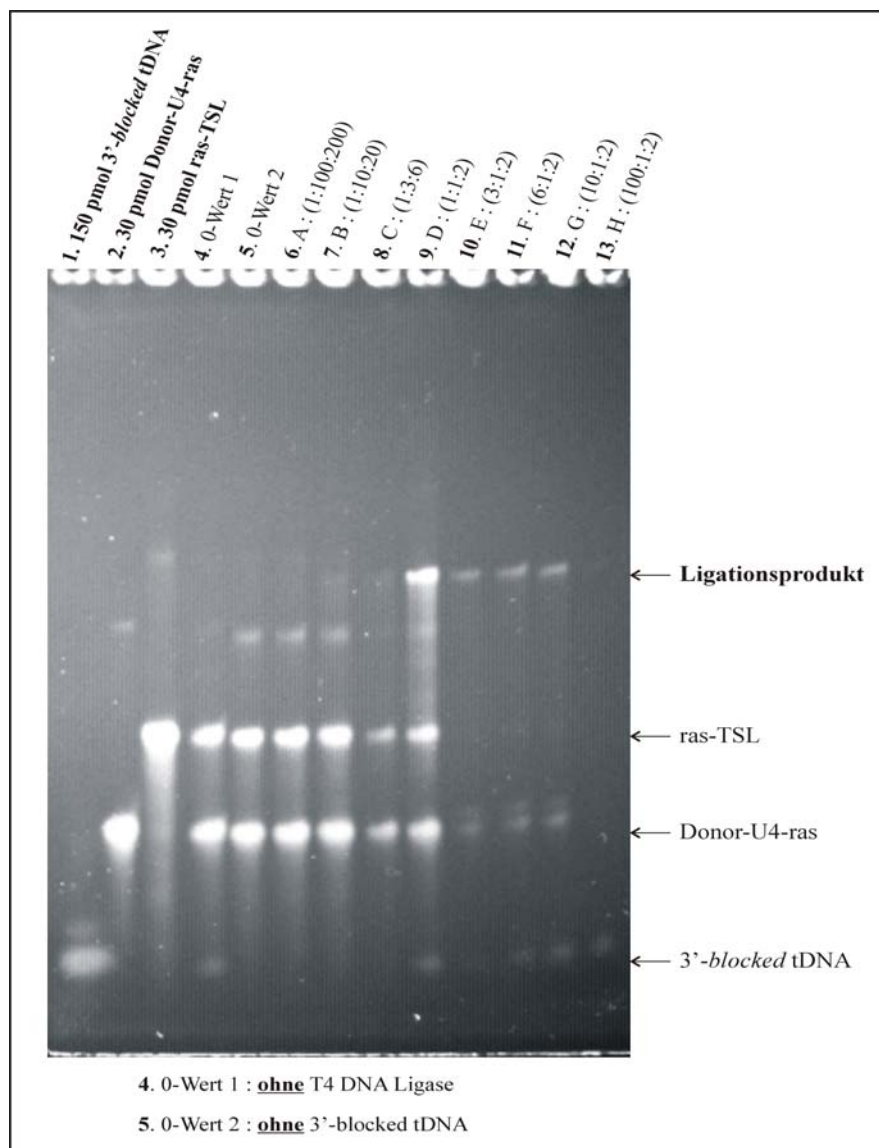
Es wurde kein großer Unterschied zwischen dem OLA und dem OLA+ $\Delta T$  beobachtet. Durch die Zugabe der doppelten Menge an Donor-U4-ras wurde jedoch der ras-TSL weitgehend umgesetzt und die Ligationsproduktbildung erhöht.

Bei dem Verhältnis ras-TSL : Donor-U4-ras von (1:2) wurde nochmals die Ligationsproduktbildung in Abhängigkeit von der 3'-*blocked* tDNA-Menge, die immer relativ zum ras-TSL berechnet wurde, getestet. Der OLA (bei 4 °C) wurde mit folgenden Verhältnissen durchgeführt :

Verhältnis in 10 $\mu$ l Ansatz	3'- <i>blocked</i> tDNA / pmol	ras-TSL / pmol	Donor-U4-ras / pmol
<b>0-Wert 1</b>	10	10	20
<b>0-Wert 2</b>	—	10	20
<b>A : (1 : 100 : 200)</b>	0,1	10	20
<b>B : (1 : 10 : 20)</b>	1	10	20
<b>C : (1 : 3 : 6)</b>	1	3	6
<b>D : (1 : 1 : 2)</b>	10	10	20
<b>E : (3 : 1 : 2)</b>	3	1	2
<b>F : (6 : 1 : 2)</b>	6	1	2
<b>G : (10 : 1 : 2)</b>	10	1	2
<b>H : (100 : 1 : 2)</b>	10	0,1	0,2

**Tabelle 4:** Getestete Verhältnisse im OLA in **Abb. 18**

Bei den Verhältnissen A-C ist die Menge der 3'-*blocked* tDNA der limitierende Faktor, da die Reaktion bei 4 °C durchgeführt wurde, bei welcher kein Schmelzen der Doppelhelix möglich sein sollte. Auf diese Weise kann nicht mehr Produkt gebildet werden, als 3'-*blocked* tDNA vorhanden ist, die nur ein Mal als Template zur Verfügung stehen kann. Bei den Verhältnissen E-H ist der limitierende Faktor der ras-TSL, da die 3'-*blocked* tDNA sowie der Donor-U4-ras im Überschuss vorhanden sind. Bei dem Verhältnis D sollte genug 3'-*blocked* tDNA vorhanden sein, um das vollständige Reagieren des ras-TSL zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in **Abb. 18** gezeigt.



**Abb. 18:** Ligationsproduktbildung im OLA bei ras-TSL : Donor-U4-ras-Verhältnis (1:2) und unterschiedlichen Mengen an 3'-*blocked* tDNA. Je 10 µl der OLA-Ansätze wurden auf einem denaturierenden 10 %-igen Polyacrylamidgel (7 M Urea) elektrophoretisch aufgetrennt.

In **Tabelle 5** sind die Verhältnisse, die zusammengehören, z.B. 3'-blocked tDNA : ras-TSL : (1:10) und (10:1), paarweise verglichen.

Vergleich von :	Intensität der Ligationsprodukte		Vergleich
<b>A</b> (1 : 100 : 200) ↔ <b>H</b> (100 : 1 : 2)	A : 0	H : 69,2	—
<b>B</b> (1 : 10 : 20) ↔ <b>G</b> (10 : 1 : 2)	B : 114,6	G : 545,3	<b>1 : 4,76</b>
<b>C</b> (1 : 3 : 6) ↔ <b>E</b> (3 : 1 : 2)	C : 118,3	E : 454,5	<b>1 : 3,84</b>

**Tabelle 5:** Vergleich der Produktbildung bei dem OLA mit Verhältnissen, aufgelistet in **Tabelle 4**

In **Tabelle 6** sind die Verhältnisse B, C, E, F, G untereinander verglichen. Bei ihnen kann maximal 1 pmol Ligationsprodukt / 10 µl Ansatz gebildet werden.

Verhältnis	Intensität der Ligationsprodukte
<b>B : (1 : 10 : 20)</b>	114,6
<b>C : (1 : 3 : 6)</b>	118,3
<b>E : (3 : 1 : 2)</b>	454,5
<b>F : (6 : 1 : 2)</b>	599
<b>G : (10 : 1 : 2)</b>	545,3

**Tabelle 6:** Vergleich der Produktbildung bei dem OLA mit Verhältnissen, aufgelistet in **Tabelle 4**

Aus **Tabelle 5** und **6** geht hervor, dass bei den Verhältnissen, bei welchen die 3'-blocked tDNA im Überschuß vorliegt, eine stärkere Produktbildung zu beobachten ist. Das Verhältnis 3'-blocked tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras (6:1:2) wurde in den meisten weiteren Versuchen als Positivkontrolle eingesetzt. Dieser Ansatz wurde als Kontrolle für die Ligationsreaktion mitgeführt.

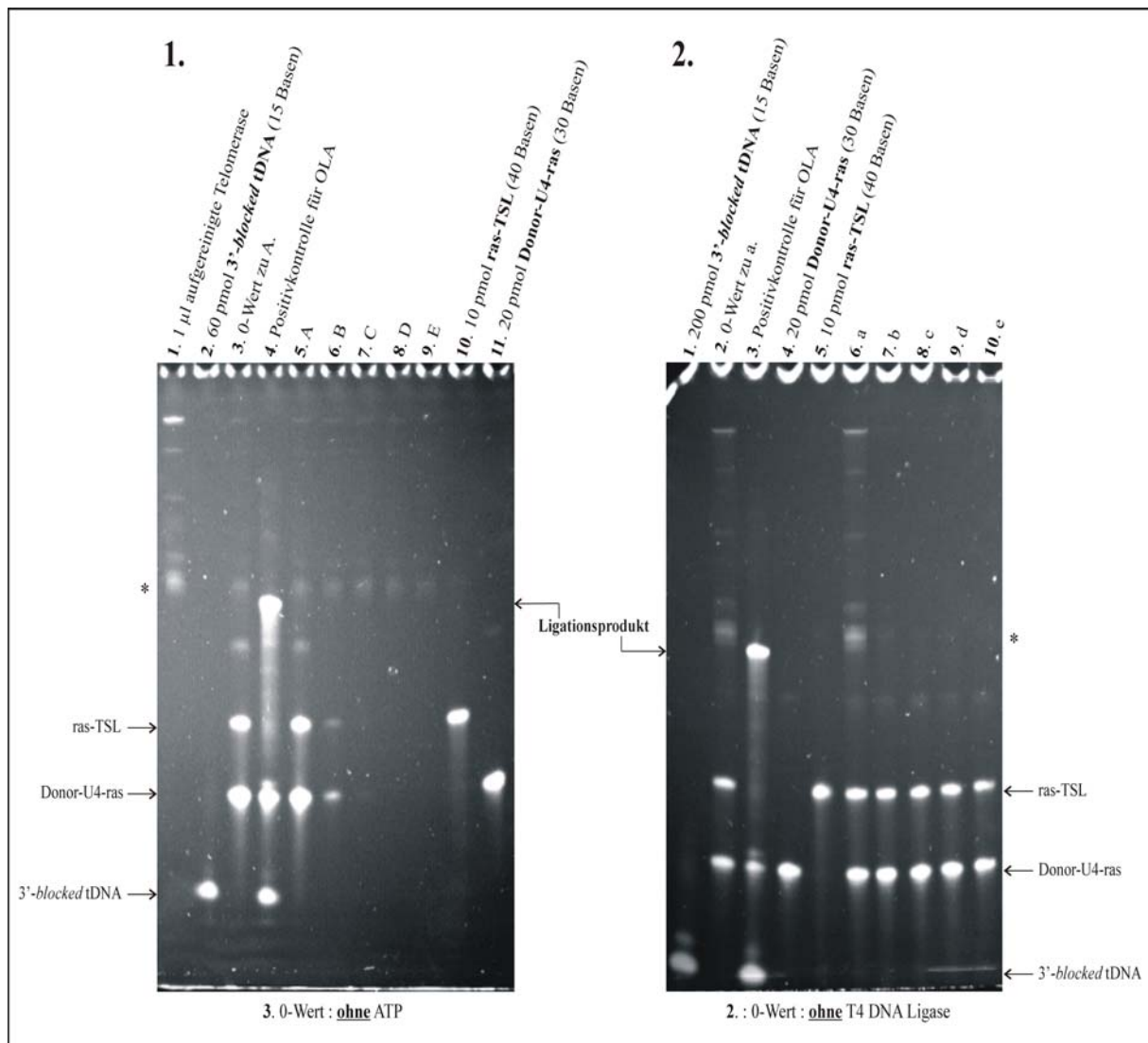
### 3.2.3 OLA mit aufgereinigter Telomerase

Mit der in 3.1.2 aus HeLa-Zellkernextrakt aufgereinigten Telomerase wurden zwei Versuchsreihen eines OLAs durchgeführt. Bei der ersten wurde die Telomerase-Menge, d.h. Template-Menge, konstant gehalten und die Konzentration der Ligationsprimer geändert, während bei der zweiten Reihe die Konzentration der Ligationsprimer in allen Ansätzen gleichgehalten wurde, und die Gesamtmenge der Telomerase verändert wurde. Auf diese Weise sollten wie in den Versuchen mit der 3'-blocked tDNA, unterschiedliche Template : Ligationsprimer-Verhältnisse erzeugt werden, um ein eventuell begünstigtes Verhältnis erfassen zu können. Es wurde immer ein ras-TSL : Donor-U4-ras Verhältnis von (1:2) eingehalten, welches sich in den Kontrollversuchen (3.2.2) als günstig erwies. Als Kontrolle für die Ligation wurde ein OLA mit der 3'-blocked tDNA mitgeführt. Es wurden dieselben Reaktionsbedingungen wie in den Kontrollversuchen eingehalten. In **Tabelle 7** sind die getesteten Verhältnisse aufgeführt.

1. Je 0,4 µl aufgereinigte Telomerase + :	2. Je 10 pmol ras-TSL + 20 pmol Donor-U4-ras + :
A. 10 pmol ras-TSL + 20 pmol Donor-U4-ras	a. 2 µl aufgereinigte Tel.
B. (10 pmol ras-TSL + 20 pmol Donor-U4-ras) x 10 <sup>-1</sup>	b. 2 µl (1:10)-Vdg. der aufgereinigten Tel.
C. (10 pmol ras-TSL + 20 pmol Donor-U4-ras) x 10 <sup>-2</sup>	c. 2 µl (1:10 <sup>2</sup> )-Vdg. der aufgereinigten Tel.
D. (10 pmol ras-TSL + 20 pmol Donor-U4-ras) x 10 <sup>-3</sup>	d. 2 µl (1:10 <sup>3</sup> )-Vdg. der aufgereinigten Tel.
E. (10 pmol ras-TSL + 20 pmol Donor-U4-ras) x 10 <sup>-4</sup>	e. 2 µl (1:10 <sup>4</sup> )-Vdg. der aufgereinigten Tel.

**Tabelle 7:** Getestete Verhältnisse von aufgereinigter Telomerase : Ligationsprimern im OLA. Die Angaben sind pro 10 µl Ansatz gemacht. Abkürzungen : **Tel.** : Telomerase, **Vdg.** : Verdünnung.

Die Ergebnisse der OLAs sind in **Abb. 19** gezeigt.



**Abb. 19:** OLA mit aufgereinigter Telomerase. Je 10 µl der Ansätze wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (7 M Urea) mittels Elektrophorese aufgetrennt. **1.:** OLA mit konstanter Menge an Telomerase und abnehmender Ligationsprimer-Konzentration; Positivkontrolle (Spur 4.) : 3'-blocked tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras : (6:1:2). **2.:** OLA mit konstanter Menge an Ligationsprimern und abnehmender Telomerase-Menge; Positivkontrolle (Spur 3.) : 3'-blocked tDNA: ras-TSL: Donor-U4-ras : (20:1:2). \* : s. nachfolgenden Text.

Bei keinem der getesteten Verhältnissen von aufgereinigter Telomerase : Ligationsprimern konnte ein Signal detektiert werden. Bei der Bande \*, welche in **1.** und **2.** (**Abb. 19**) etwas höher als das Ligationsprodukt läuft, handelt es sich um Nukleinsäuren, die von dem Ionenaustauscher miteluiert wurden (s. Spur 1. in **1.**), bzw. um eine Verunreinigung des ras-TSL (s. Spur 10. in **1.**).

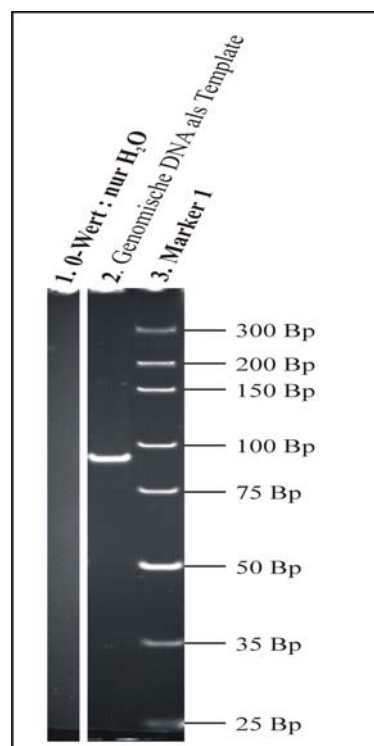


Da direkt keine Ligationsproduktbildung nachgewiesen werden konnte, sollten mögliche Produkte mit der ras-PCR amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die ras-PCR mit genomischer DNA und den OLA-Ansätzen mit der Positivkontrolle (**Tabelle 4**) optimiert.

### 3.2.4 Optimierung der ras-PCR mit genomischer DNA

Um die optimalen  $T_a$  für die ras-PCR zu finden, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die ras-PCR wurde mit genomischer DNA als Template optimiert. Dieser Ansatz sollte die Positivkontrolle für die PCR sein. Die genomische DNA sollte später auch zu den OLA-Ansätzen zugegeben werden und als interner Standard für die ras-PCR dienen.

Als optimale  $T_a$  wurde  $66^\circ\text{C}$  ermittelt. Die ras-PCR mit dieser  $T_a$  ist in **Abb. 20** gezeigt. Als Produkt wurde ein 91 Bp langes Fragment erwartet. In dieser PCR wurde, wie in allen PCRs dieser Arbeit, *Taq* DNA Polymerase eingesetzt. Da die *Taq* DNA Polymerase dA-Anhänge an beiden 3'-Enden anfügt, ist das Produkt 91 Bp + zwei dA-Anhänge lang. Dies gilt auch für alle anderen PCR-Produkte, es wird jedoch weiter nur die Länge des Doppelstrangs, ohne die beiden dA-Anhänge, erwähnt.

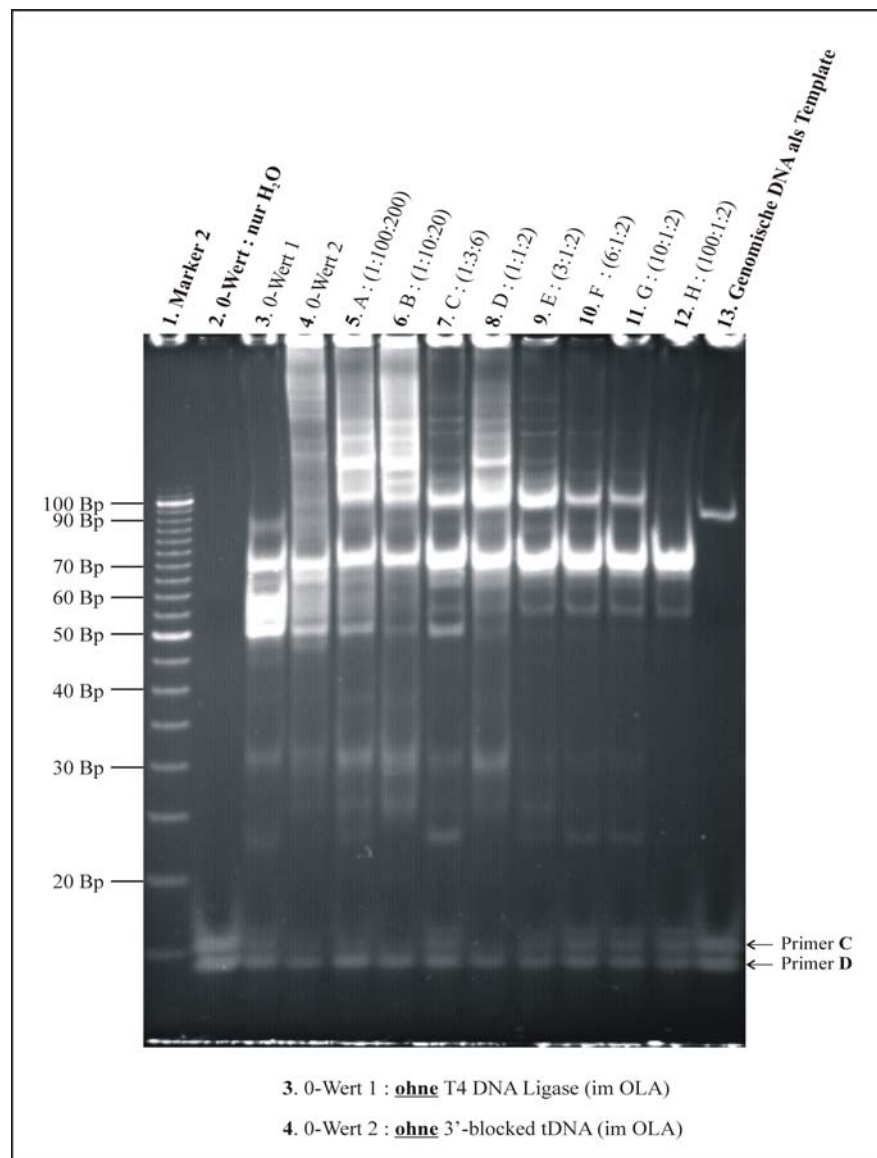


**Abb. 20:** ras-PCR mit genomischer DNA als Template. Je 12,5  $\mu\text{l}$  der PCR-Ansätze wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese aufgetrennt.

### 3.2.5 Optimierung der ras-PCR mit der Positivkontrolle

#### 3.2.5.1 ras-PCR mit Taq DNA Polymerase

Mit den OLA-Ansätzen aus **Tabelle 4** wurde eine ras-PCR durchgeführt. Es wurde eine sehr starke Nebenproduktbildung beobachtet, welche die Analyse unmöglich machte. Die Produkte der ras-PCR mit der Positivkontrolle sind in **Abb. 21** gezeigt. Erwartet wurde ein Produkt mit einer Länge von 70 Bp.

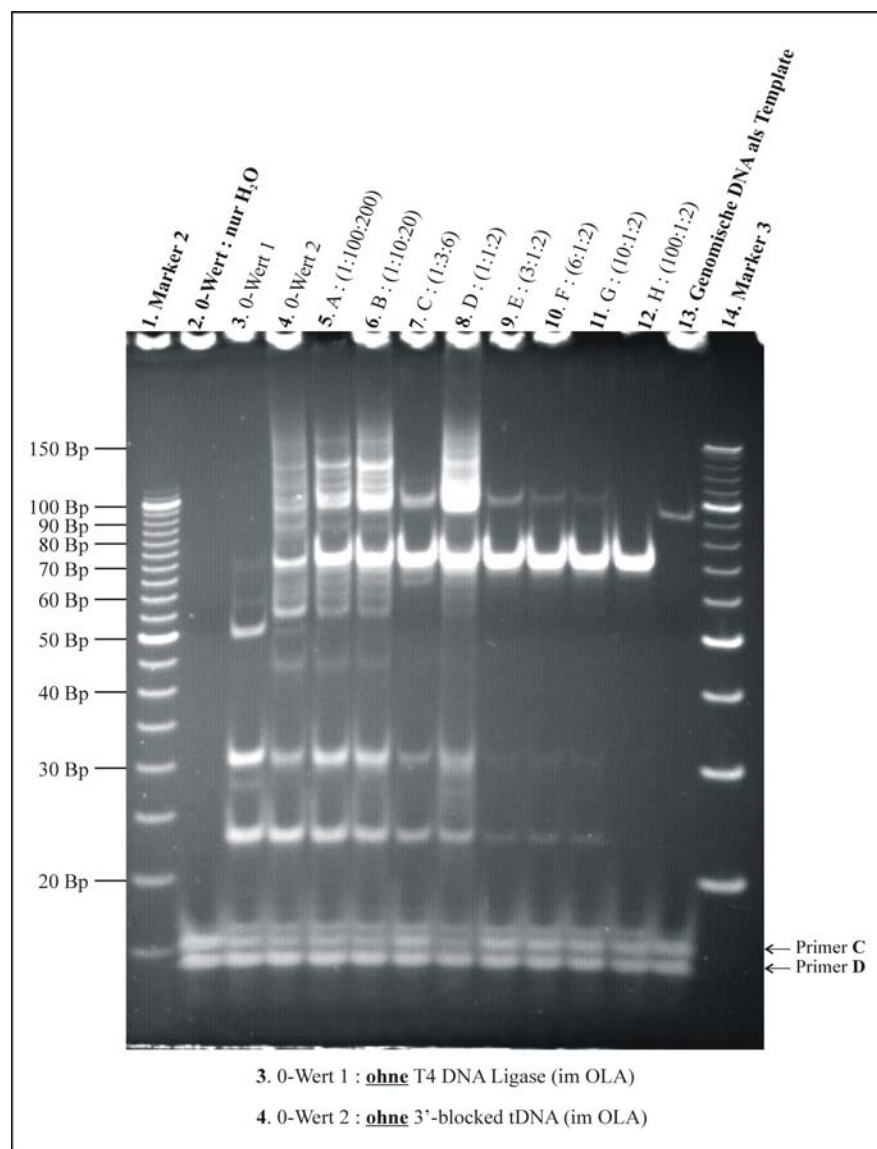


**Abb. 21:** ras-PCR mit den OLA-Ansätzen mit der Positivkontrolle aus **Tabelle 4**. Je 1 µl dieser Ansätze wurde in der PCR eingesetzt. Spur 2. enthält 1 µl H<sub>2</sub>O und stellt die Negativkontrolle der ras-PCR dar. Die ganzen PCR-Ansätze (25 µl) wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Besonders starke Nebenproduktbildung wurde in Spuren **3.–6.**, und **8.** beobachtet. In diesen Ansätzen ist die Konzentration der Ligationsprimer, welche in die PCR eingebracht werden, gleichgroß und im Vergleich zu den restlichen Ansätzen am größten. Dies führte zu der Vermutung, dass die Ligationsprimer allein oder in Kombination mit den Primern der ras-PCR (Primer C und D) die Ursache für diese unspezifischen Produkte sind. Primer C und D führen unter den ras-PCR-Bedingungen zu keiner Nebenproduktbildung (s. Spur **2.**).

#### *3.2.5.2 ras-PCR mit Hot Start Taq DNA Polymerase*

Da die ras-PCR mit einer normalen *Taq* DNA Polymerase nicht auswertbar war, wurde eine Hot Start *Taq* DNA Polymerase anstelle der *Taq* DNA Polymerase eingesetzt. Die  $T_a$  von 66 °C wurde beibehalten. Die Ergebnisse sind in **Abb. 22** wiedergegeben.



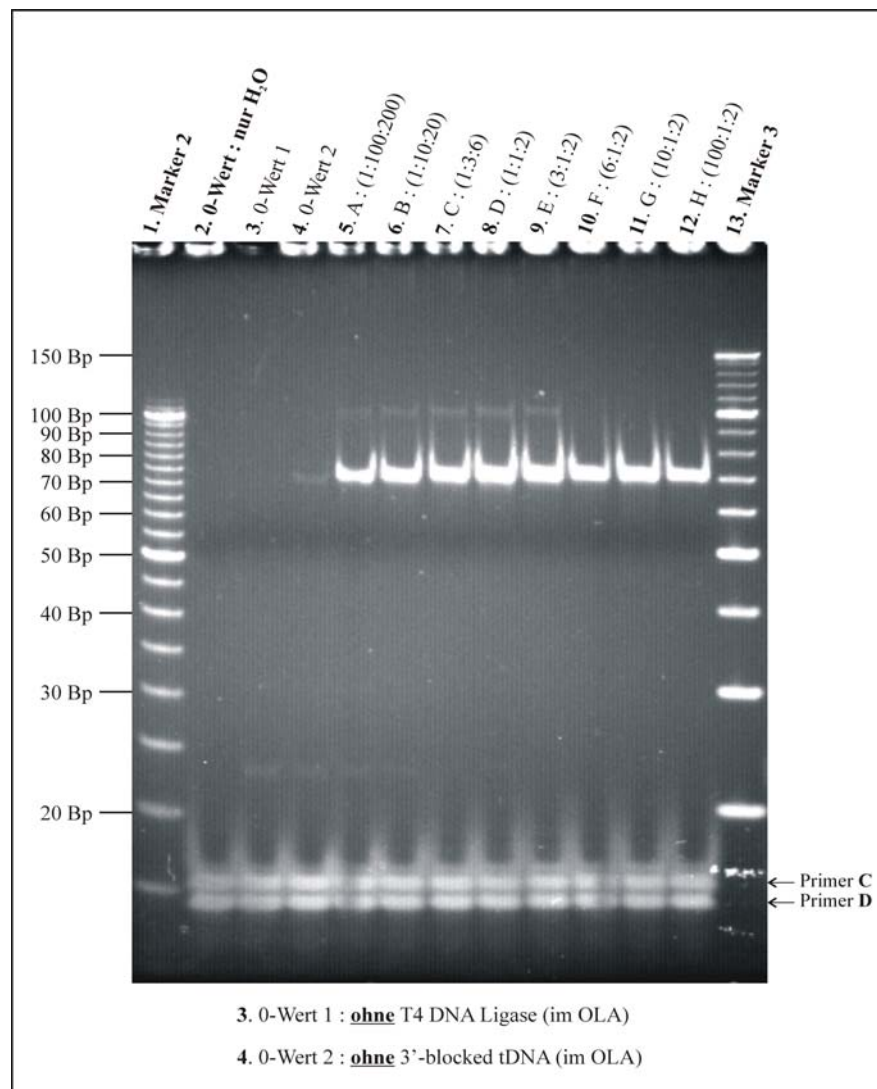
**Abb. 22:** ras-PCR mit den OLA-Ansätzen mit der Positivkontrolle aus **Tabelle 4**. Je 1 µl dieser Ansätze bzw. 1 µl H<sub>2</sub>O wurde in der Hot Start PCR eingesetzt. Die ganzen PCR-Ansätze (25 µl) wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese aufgetrennt.

Mit Hilfe der Hot Start *Taq* DNA Polymerase konnte die Nebenproduktbildung zum Teil reduziert werden. Am stärksten war sie jedoch wieder in den PCR-Ansätzen, in denen die Ligationsprimer in höchster Konzentration vorhanden waren. Wie in der ras-PCR mit der normalen *Taq* DNA Polymerase (3.2.5.1) wurden in der ras-PCR mit 0-Wert 1 und 2 unspezifische Produkte auf Höhe der erwarteten Produktbande gebildet.

Trotz der Schwierigkeiten bei der Optimierung der ras-PCR mit der Hot Start *Taq* DNA Polymerase (s. **Abb. 22**), wurden je 1 µl der OLA-Ansätze mit der aufgereinigten Telomerase aus **Abb. 19** (s. **3.2.3**) in der ras-PCR eingesetzt. Sehr starke Nebenproduktbildung machte die Auswertung unmöglich.

### 3.2.5.3 Ursache für die PCR-Artefakte

Um zu testen, ob die Ligationprimer-Konzentration die Nebenproduktbildung beeinflusst, wurde eine ras-PCR mit einer (1:100)-Verdünnung der Ansätze aus **Tabelle 4** durchgeführt. Das Ergebnis ist in **Abb. 23** dargestellt.



**Abb. 23:** ras-PCR mit einer (1:100)-Verdünnung der OLA-Ansätze mit der Positivkontrolle aus **Tabelle 4**. Je 1 µl dieser Ansätze bzw. H<sub>2</sub>O wurde in der Hot Start PCR eingesetzt. Die ganzen PCR-Ansätze (25 µl) wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

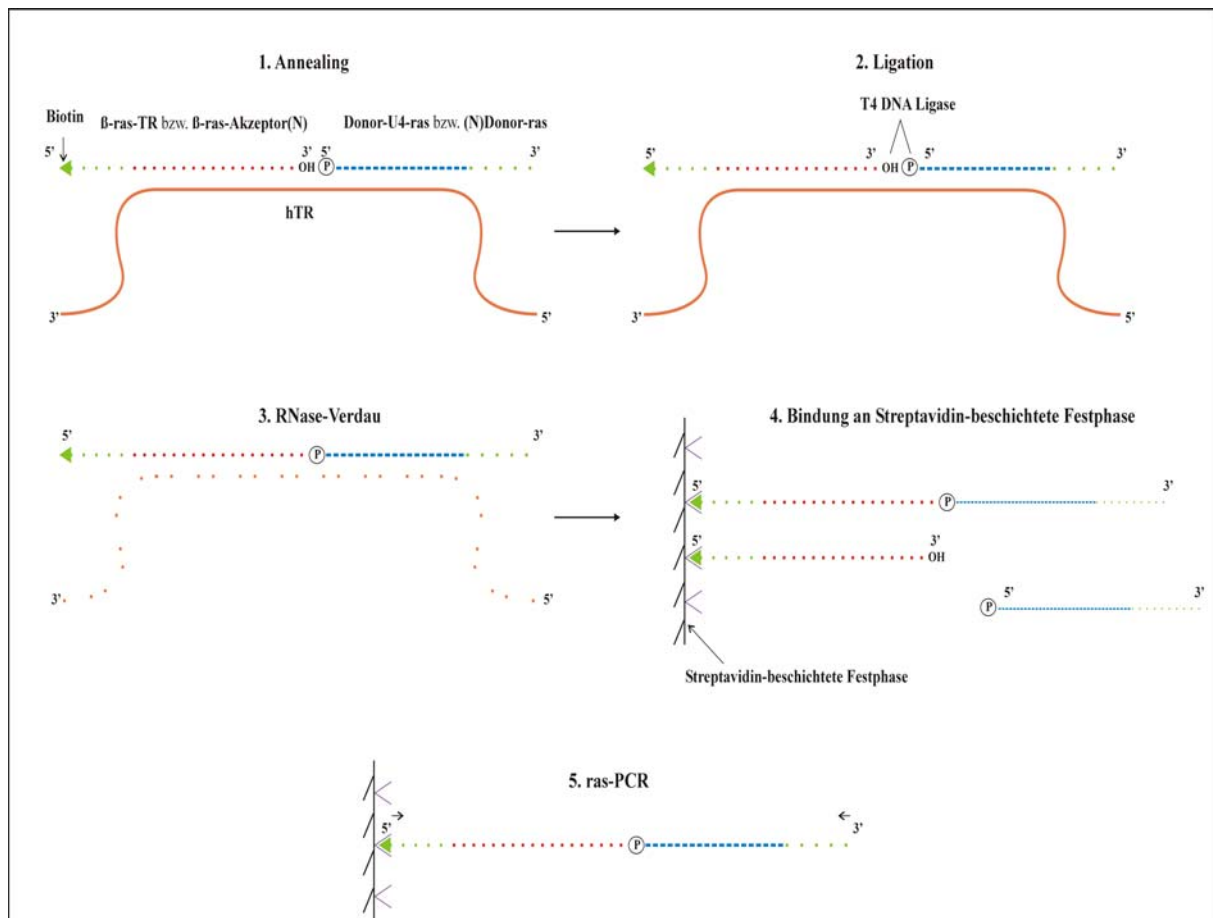
Mit der Verdünnung der Proben, d.h. mit dem Heruntersetzen der Konzentration der Ligationsprimer, wurde die Nebenproduktbildung sehr stark reduziert.

Um festzustellen, welcher Ligationsprimer der Grund für die Nebenproduktbildung war, wurde eine PCR nur mit den Ligationsprimern bzw. ras-Primern allein oder kombiniert, ohne 3'-*blocked* tDNA durchgeführt. Die ras-Primer wurden in der Standardkonzentration für die ras-PCR zugegeben, während von den Ligationsprimern Konzentrationen gewählt wurden, welche in Vorversuchen zu starker Nebenproduktbildung geführt hatten.

Es stellte sich heraus, dass Primer C und D zusammen, sowie ras-TSL+C / ras-TSL+D / ras-TSL+Donor-U4-ras zu keiner unspezifischer Produktbildung führen. Die Kombination Donor-U4-ras+C / Donor-U4-ras+D / ras-TSL+ Donor-U4-ras+C / ras-TSL+ Donor-U4-ras + D / ras-TSL+ Donor-U4-ras+C+D führte jedoch zu Nebenproduktbildung. Die Ursache war der Donor-U4-ras. Um dies zu umgehen wurde ein Versuchsablauf entwickelt, welcher ermöglichen sollte, den Donor-U4-ras nach der Ligation aus dem System zu entfernen und die ras-PCR in einer „Donor-U4-ras-freien“ Umgebung stattfinden zu lassen.

### 3.2.6 OLA mit der Telomerase-RNA (hTR)

Da im OLA mit der aufgereinigten Telomerase direkt kein Produkt nachgewiesen werden konnte, und die Nebenproduktbildung in der ras-PCR keine eindeutige Analyse möglich machte, wurde der OLA modifiziert. Bei dem OLA mit dem Telomerase-Molekül können sterische Hindernisse, welche durch die Protein-Untereinheit entstehen, die Zugänglichkeit der T4 DNA Ligase zu ihrem Wirkungsort stören. Aus diesem Grund sollte ein OLA mit hTR als Template gestartet werden. Der andere Vorteil war, dass die ganze hTR-Sequenz zur Verfügung stand, so dass Ligationsprimer, welche mit mehr Basen als der ras-TSL und der Donor-U4-ras an das Template hybridisieren, eingesetzt werden konnten. Zusätzlich sollte der Donor der Ligrationsreaktion nach dem OLA aus dem System entfernt werden. Die Strategie des modifizierten OLAs ist in **Abb. 24** wiedergegeben.



**Abb. 24:** Schematische Darstellung des modifizierten OLAs

Im ersten Schritt sollte ein Annealing des Templates (hTR) mit den Ligationsprimern stattfinden. Hier wurde ein neuer Ligationsprimer (Akzeptor) eingesetzt. Da die Protein-Untereinheit, deren *anchor site* von einem Teil des ras-TSLs gebunden wird, nicht mehr vorhanden ist, wurde die Sequenz des ras-TSLs geändert. Der neue Akzeptor, β-ras-TR, ist komplementär zu denselben 5 Template-Basen der hTR wie der ras-TSL, 5'-terminal ist er jedoch um 15 Basen verlängert, die komplementär zu den 15 Basen sind, die sich *downstream* von dem Template der hTR befinden. Er endet in derselben ras-Sequenz wie der ras-TSL und trägt am 5'-Ende eine Biotin-Gruppe. Der Donor-U4-ras wurde beibehalten. Bei diesem Ligationsprimerpaar konnte die 3'-blocked tDNA auch als Positivkontrolle für den OLA dienen.

Im nächsten Schritt sollten beide Primer ligiert, und, nach Denaturierung des RNA:DNA-Hybrids, das RNA-Template mittels RNase verdaut werden. Der β-ras-TR sowie das eventuell

entstandene Ligationsprodukt, das ebenfalls 5'-biotinyliert ist, sollten im nächsten Schritt an die Wände eines Streptavidin-beschichteten PCR-*Tubes* gebunden werden. Nach Waschen sollte das an der Festphase gebundene Ligationsprodukt mittels ras-PCR nachgewiesen werden. Bei dem Waschvorgang sollte der Donor-U4-ras aus dem System entfernt werden und die nachfolgende ras-PCR nicht stören können. In der PCR wurde ein Produkt mit einer Länge von 70 Bp erwartet.

Im modifizierten OLA sollte auch ein neues Ligationsprimerpaar eingesetzt werden. Mit dem Programm Primer3 [223] und den Publikationen von Nilsson et al. [211,212] wurden die optimalen Primer und Bedingungen für einen OLA mit einer RNA als Template und einer nachfolgenden PCR ausgewählt. Der Akzeptor ( $\beta$ -ras-Akzeptor(N)) hat eine Länge von 40 Basen und ist am 5'-Ende biotinyliert. Der Donor ((N)Donor-ras) trägt am 5'-Ende eine Phosphatgruppe und ist 35 Basen lang. Beide Ligationsprimer enthalten eine 20 Basen lange, terminale ras-Sequenz, welche für die Amplifikation mittels PCR genutzt wird. Der  $\beta$ -ras-Akzeptor(N) ist komplementär zu 20 Basen der hTR und der (N)Donor-ras zu den 15 benachbarten Basen. Das erwartete Ligationsprodukt hat eine Länge von 75 Basen.

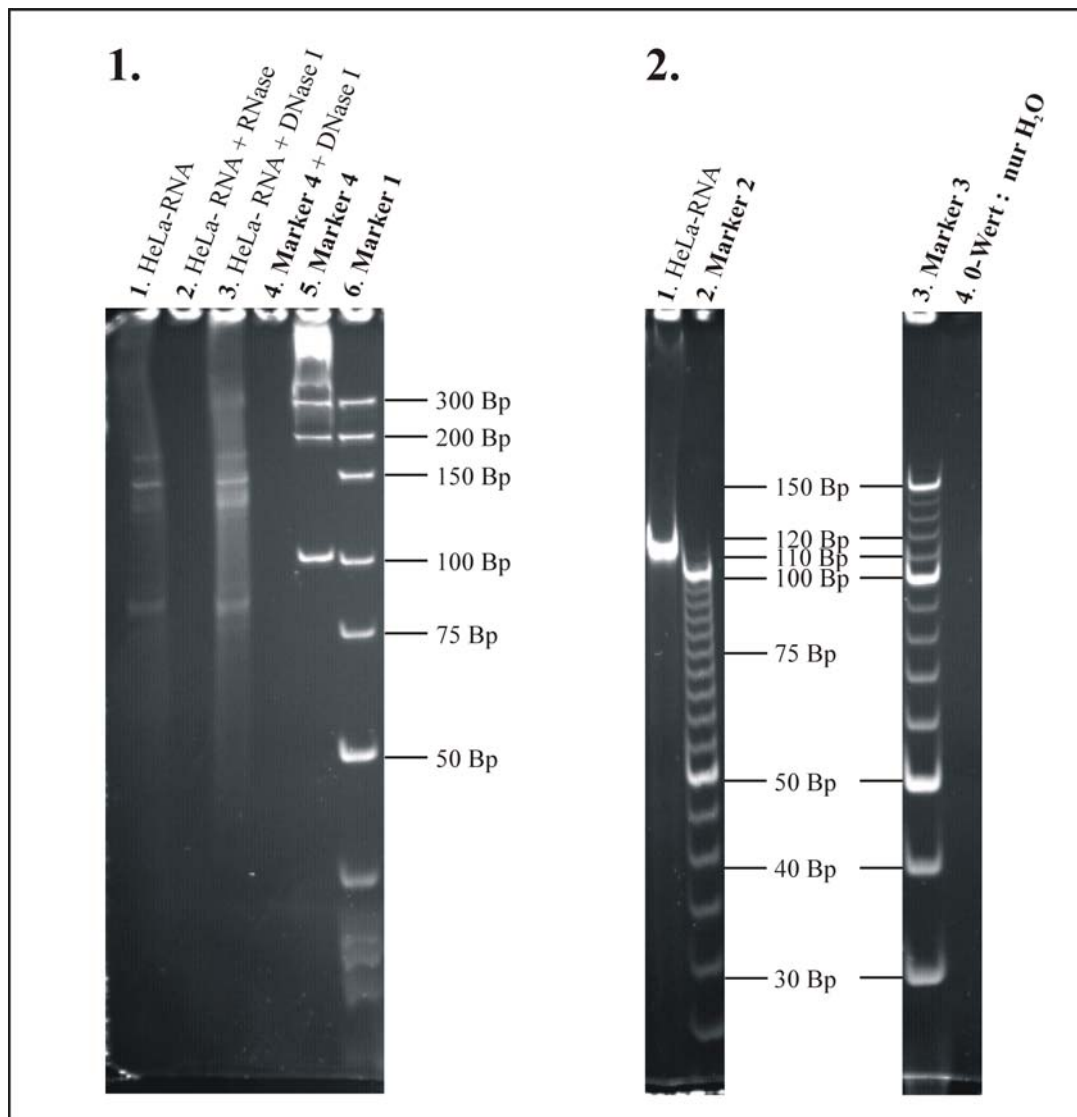
Da bei dem OLA mit hTR als Template Ligationsprimer eingesetzt wurden, welche die hTR stärker binden als der ras-TSL und Donor-U4-ras, sollte der OLA bei 37°C durchgeführt werden.

In diesem System sollte auch die genomische DNA als interner Standard eingesetzt werden. Deshalb wurde die ras-PCR mit der Hot Start *Taq* DNA Polymerase und der genomischen DNA als Template neu optimiert. In der Gradienten-PCR wurde eine optimale  $T_a$  von 64,5 °C gefunden.

#### 3.2.6.1 Isolierung von HeLa-RNA und Nachweis der hTR mittels Reverse-Transkriptase-PCR

Für den modifizierten OLA wurde RNA aus HeLa-Zellkernextrakt isoliert. Die hTR, welche in der Gesamt-RNA enthalten ist, wurde mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) nachgewiesen. Vor der reversen Transkription sowie vor dem modifizierten OLA wurde mit der isolierten RNA ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass das detektierte Signal nicht von genomischer DNA, sondern von der hTR stammt. Das erwartete RT-PCR-Produkt hat eine Länge von 111 Bp und ist zusammen mit den Kontrollen in **Abb. 25** gezeigt.





**Abb. 25:** Reverse-Transkriptase-PCR mit HeLa-RNA und die entsprechenden Kontrollen. **1.:** Es wurde je 1  $\mu$ l der HeLa-RNA auf das Gel aufgetragen sowie in dem DNaseI- bzw. RNase-Verdau eingesetzt, welcher mitaufgetragen wurde. Als Kontrolle für den DNaseI-Verdau wurden 0,5  $\mu$ g Marker 4 verdaut, und zum Vergleich wurde dieselbe Menge von dem Marker 4 auf das 10 %-ige Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. **2.:** 3/40 der isolierten RNA wurden in die Reverse-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. 1/10 der Reverse-Transkriptase-Ansätze wurden in die PCR gegeben. 20  $\mu$ l der PCR-Ansätze wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese aufgetrennt.

Die Sequenzierung des RT-PCR-Produkts bestätigte, dass es sich bei der beobachteten Bande mit Länge 111 Bp um das erwartete Produkt handelt.

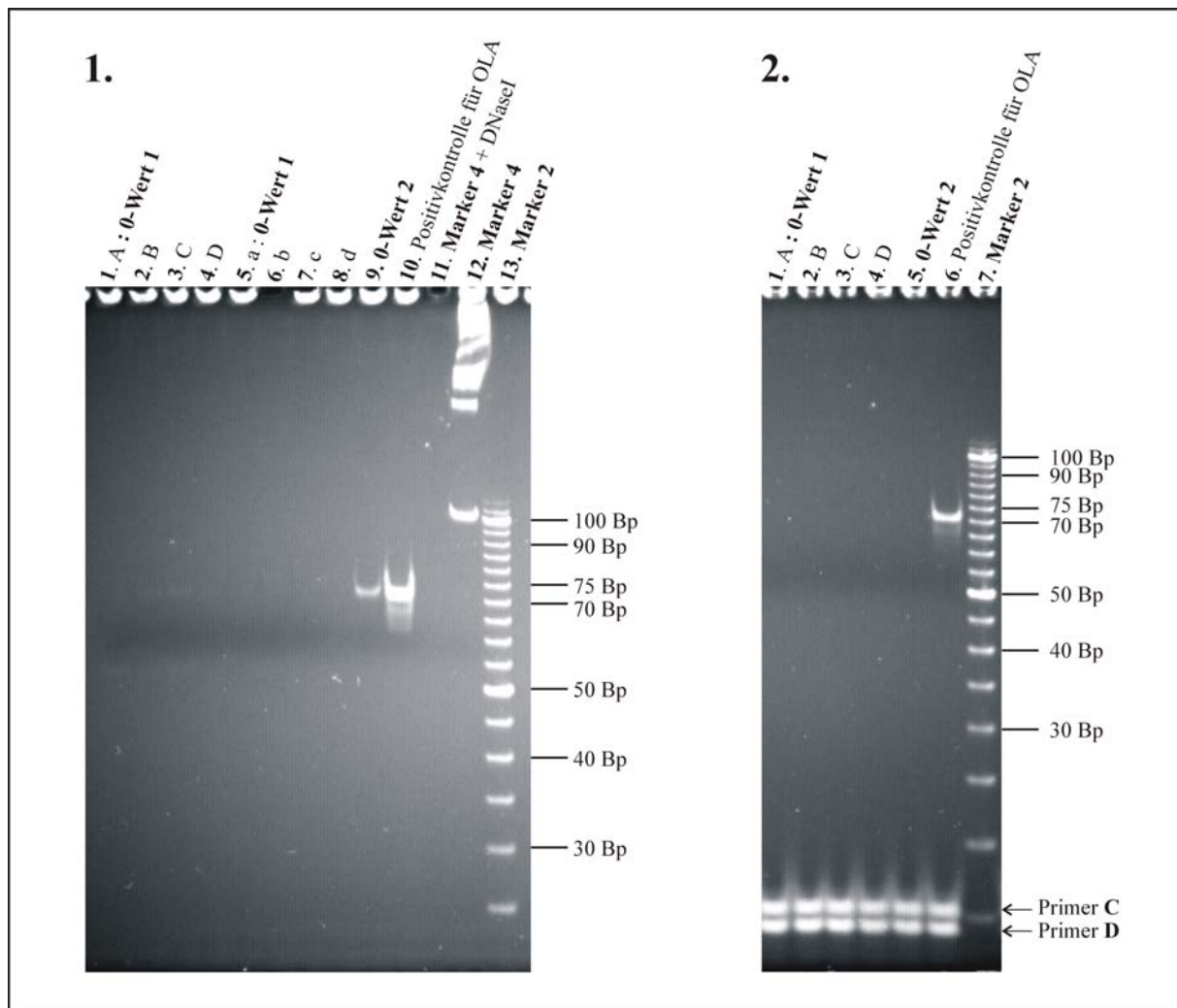
### 3.2.6.2 Modifizierter OLA mit $\beta$ -ras-TR und Donor-U4-ras bzw. $\beta$ -ras-Akzeptor(N) und (N)Donor-ras

Mit der isolierten Gesamt-RNA wurde ein modifizierter OLA mit beiden Ligationsprimerpaaren gestartet. Es wurde wieder ein Akzeptor : Donor- Verhältnis von (1:2) eingehalten, und eine Oligonukleotid-Reihe getestet. In **Tabelle 8** sind die getesteten Verhältnisse aufgelistet. Vor dem OLA wurde die Gesamt-RNA mit DNaseI verdaut.

<b>Ligationsprimer : <math>\beta</math>-ras-TR + Donor-U4-ras</b>	
<b>A. 0-Wert 1</b>	2,5 pmol $\beta$ -ras-TR + 5 pmol Donor-U4-ras : <b>ohne</b> HeLa-RNA
<b>B.</b>	2,5 pmol $\beta$ -ras-TR + 5 pmol Donor-U4-ras : mit HeLa-RNA
<b>C.</b>	1,25 pmol $\beta$ -ras-TR + 2,5 pmol Donor-U4-ras : mit HeLa-RNA
<b>D.</b>	0,625 pmol $\beta$ -ras-TR + 1,25 pmol Donor-U4-ras : mit HeLa-RNA
<b>0-Wert 2</b>	2,5 pmol $\beta$ -ras-TR + 5 pmol Donor-U4-ras + 15 pmol 3'-blocked tDNA : <b>ohne</b> T4 DNA Ligase
<b>Positivkontrolle für OLA</b> : 2,5 pmol $\beta$ -ras-TR + 5 pmol Donor-U4-ras + 15 pmol 3'-blocked tDNA	
<b>Ligationsprimer : <math>\beta</math>-ras-Akzeptor(N) + (N)Donor-ras</b>	
<b>a. 0-Wert 1</b>	2,5 pmol $\beta$ -ras-Akzeptor(N) + 5 pmol (N)Donor-ras : <b>ohne</b> HeLa-RNA
<b>b.</b>	2,5 pmol $\beta$ -ras-Akzeptor(N) + 5 pmol (N)Donor-ras : mit HeLa-RNA
<b>c.</b>	1,25 pmol $\beta$ -ras-Akzeptor(N) + 2,5 pmol (N)Donor-ras : mit HeLa-RNA
<b>d.</b>	0,625 pmol $\beta$ -ras-Akzeptor(N) + 1,25 pmol (N)Donor-ras : mit HeLa-RNA

**Tabelle 8:** Getestete Verhältnisse der Ligationsprimer im modifizierten OLA. Die Angaben sind pro OLA-Gesamtansatz nach RNase-Verdau (50  $\mu$ l) gemacht.

In **Abb. 26** ist das Ergebnis des modifizierten OLAs gezeigt.



**Abb. 26:** Modifizierter OLA mit  $\beta$ -ras-TR und Donor-U4-ras bzw.  $\beta$ -ras-Akzeptor(N) und (N)Donor-ras. Es wurden 25  $\mu$ l aller RNase-verdauten OLA-Ansätze (1.) bzw. 5  $\mu$ l der Ansätze A-D und der zugehörigen Kontrollen (2.) in die Streptavidin-beschichteten PCR-Tubes pipettiert. Nach Inkubation und Waschen wurde in den PCR-Tubes eine ras-PCR mit Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l gestartet. Je 25  $\mu$ l dieser PCR-Ansätze wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Auf das Gel wurden auch die Kontrollen für den DNaseI-Verdau aufgetragen. Als Kontrolle wurde 0,5  $\mu$ g Marker 4 verdaut, und zum Vergleich wurde dieselbe Menge von Marker 4 auf dem Gel mitgeführt.

Im modifizierten OLA konnten beim Auftragen von 25  $\mu$ l des OLA-Ansatzes in die Streptavidin-beschichteten PCR-Tubes mit dem Ligationsprimerpaar  $\beta$ -ras-TR/Donor-U4-ras nur Spuren von Produkt detektiert werden (Spur 2. und 3. in 1.). Dieses Ergebnis konnte nicht bei allen Wiederholungsversuchen reproduziert werden. Bei einem Auftrag von 5  $\mu$ l verschwand diese Bande (Spur 2. und 3. in 2.). Die Bande auf Produkthöhe in Spur 9. in 1.

verschwindet bei einem geringeren Auftrag (Spur **5.** in **2.**). Sie war nicht-reproduzierbar, und bei ihr handelt es sich wahrscheinlich um ein PCR-Artefakt.

Mit dem Ligationsprimerpaar  $\beta$ -ras-Akzeptor(N)/(N)Donor-ras konnten beim Autragen von 25  $\mu$ l nicht-reproduzierbar winzige Signale auf der Höhe von 75 Bp detektiert werden. Da sie auch in einem Teil der Versuche in Ansatz **a.** (0-Wert) zu detektieren waren, handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Produkte der PCR.

Während mit dem modifizierten OLA nur vernachlässigbar kleine Signale nachgewiesen werden konnten, gelang mit der RT-PCR eine erfolgreiche und eindeutige Detektion der hTR (**3.2.6.1**). Aus diesem Grund sollte die hTR aus dem Telomerase-Molekül im zweiten Schritt des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase mit einer RT-PCR detektiert werden.

### **3.3 Immobilisierung der Telomerase an die Festphase**

In dem ersten Schritt des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase sollte das Enzym spezifisch an der Protein-Untereinheit an eine Festphase gebunden werden. Für eine solche Bindung waren Heparin- bzw. Phosphorothioat-beschichtete Festphasen geeignet.

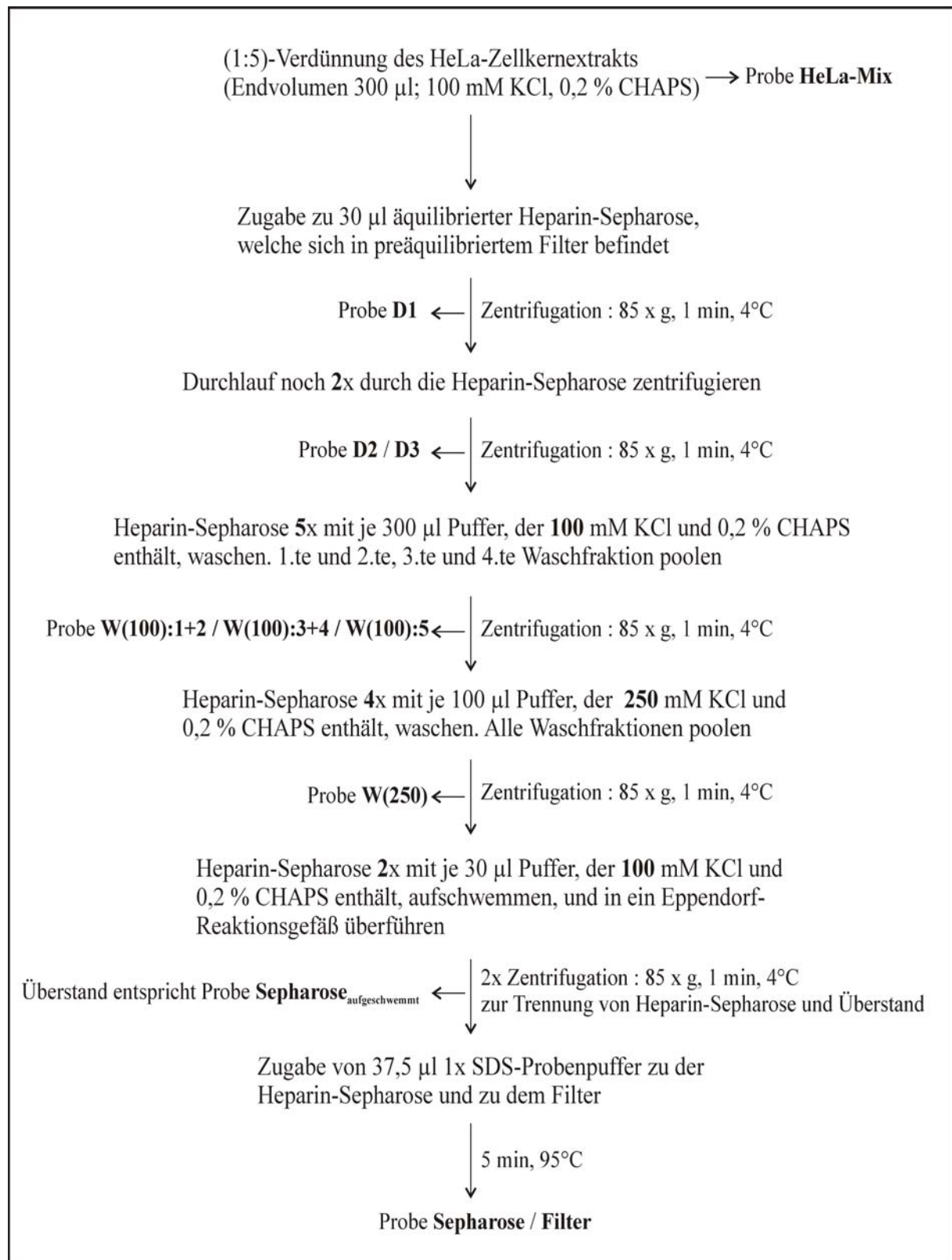
#### **3.3.1 Immobilisierung der Telomerase an Heparin-Sepharose**

Für die Bindung der Telomerase an die Heparin-beschichtete Festphase wurde Heparin-Sepharose, welche käuflich zu erwerben ist, eingesetzt. Die Bindungsbedingungen wurden Pai et al. [224] entnommen und modifiziert. Als Telomerase-Quelle wurde das HeLa-Zellkernextrakt eingesetzt. Es wurden unterschiedliche Verfahren zur Bindung der Telomerase an die *Beads* eingesetzt. Das Binden im *Batch*-Verfahren wurde durch ein „Zentrifugations“-Verfahren ersetzt. Beim letzteren wurde die Telomerase-haltige Probe durch äquilibrierte Heparin-Sepharose *Beads*, die sich in einem Filter befanden, durchzentrifugiert. Der Durchlauf wurde noch zweimal über die *Beads* gegeben. Anfänglich wurde wie bei Pai et al. bei 25 mM KCl gebunden, dann jedoch die KCl-Konzentration auf 100 mM hochgesetzt, sowie 0,2 % CHAPS zu allen Puffern gegeben, um unspezifische Bindungen an die Heparin-Sepharose und den Filter zu unterbinden.

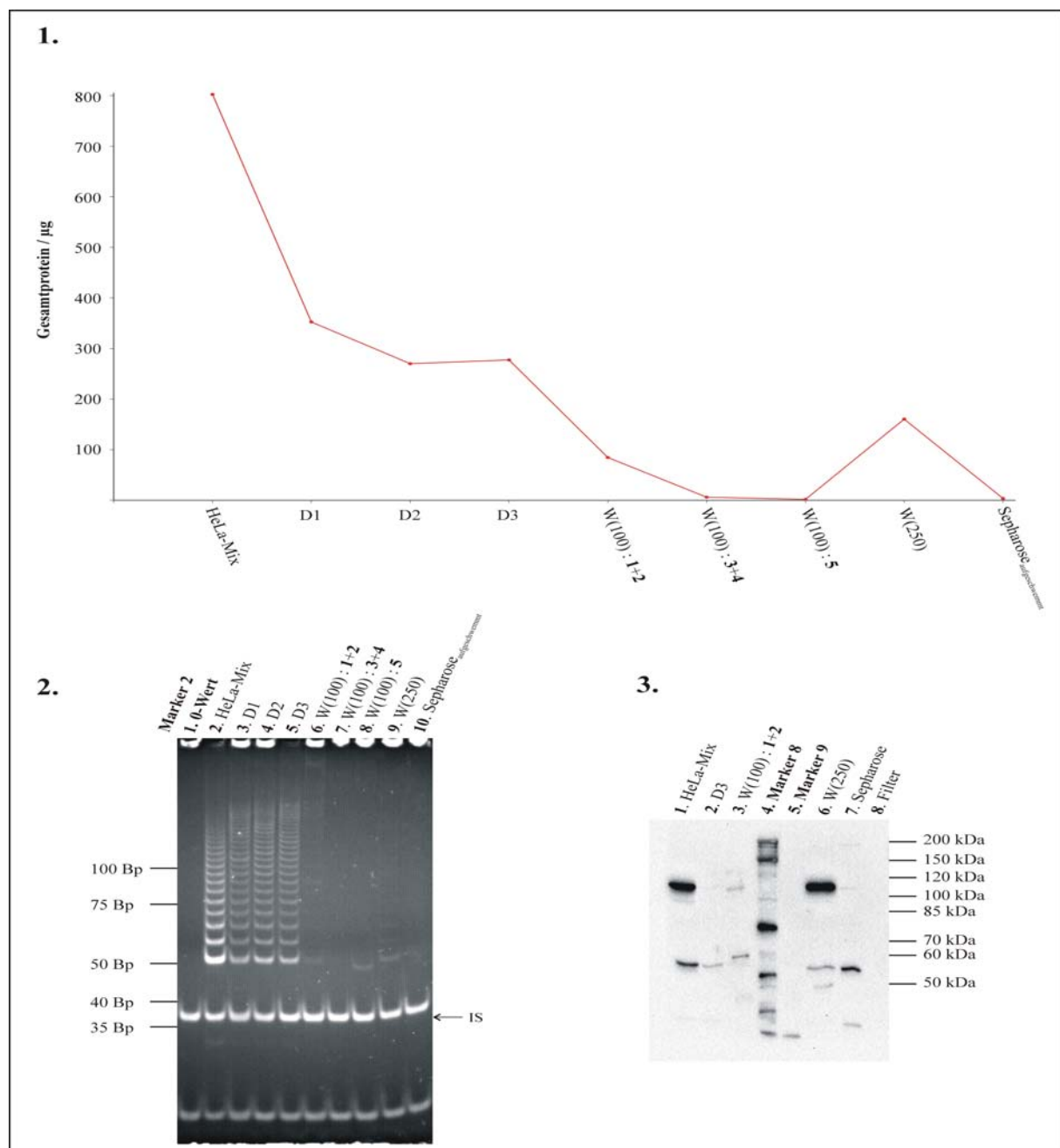
Die einzelnen Proben wurden auf Telomerase-Aktivität mit dem TRAP-Assay analysiert und zusätzlich im Western-Blot mit einem anti-hTERT-Antikörper. Da Heparin die Telomerase hemmt und kein TRAP-Assay mit der Heparin-gebundenen Telomerase möglich ist, sollte mit dem Western-Blot die Effektivität der Telomerase-Bindung bestimmt werden.

Es wurden unterschiedliche anti-Telomerase-Antikörper getestet. Der TERT (H-231) von Santa Cruz erkannte im Gegensatz zu den meisten anderen Antikörpern keine unspezifischen Banden in dem Bereich, in dem das Telomerase-Signal erwartet wurde. Die detektierte Bande lief etwas tiefer, bei ca. 110 kDa, und nicht wie erwartet bei 127 kDa, was jedoch vom Hersteller als normal beschrieben wurde. Dieser Antikörper wurde in der Western-Blot-Analyse eingesetzt.

Das Bindungsverfahren ist in **Abb. 27** dargestellt, die Ergebnisse in **Abb. 28**.



**Abb. 27:** Schematische Darstellung der Bindung der Telomerase an die Heparin-Sepharose. Abkürzungen: **D** : Durchlauf, **W** : Waschfraktion.



**Abb. 28:** Bindung der Telomerase an die Heparin-Sepharose. **1.:** Verteilung der Proteinmengen in den verschiedenen Fraktionen auf Basis der Bradford-Proteinbestimmung. Je 10  $\mu\text{l}$  des Proteinstandards bzw. der getesteten Fraktionen wurden in der Bradford-Proteinbestimmung eingesetzt. **2.:** TRAP-Assay mit den verschiedenen Fraktionen. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Alle Proben wurden (1:20) mit CHAPS-Puffer verdünnt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden äquivalente Mengen von den (1:20)-verdünnten Fraktionen eingesetzt. Der 0-Wert enthielt 4  $\mu\text{l}$  CHAPS-Puffer. 1/4 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25  $\mu\text{l}$ ) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. **3.:** Western-Blot Analyse. Äquivalente Mengen von den Fraktionen wurden mit einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem TERT (H-231) Antikörper inkubiert.

Im Durchlauf (D3) wurde starke Telomerase-Aktivität beobachtet (36-76 % des HeLa-Mix-Signals), somit war die Bindung der Telomerase an die Heparin-Sepharose im „Zentrifugations“-Verfahren suboptimal. Eine schwache Telomerase-Aktivität wurde mit 250 mM KCl von der Heparin-Sepharose, zusammen mit einer Vielzahl von anderen Proteinen, eluiert. Beim Vergleich des Aktivitäts-Tests mit dem Western-Blot stimmten die aktiven Fraktionen im TRAP-Assay mit den Fraktionen, die ein Signal im Western-Blot gaben, nicht überein.

Da die Telomerase nicht effektiv an die Heparin-Sepharose gebunden werden konnte, sollte die Immobilisierung der hTERT an die Festphase über Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide erfolgen.

### **3.3.2 Bindung der Telomerase aus HeLa-Zellkernextrakt an *Beads*, beschichtet mit Phosphorothioat-modifizierten (PS)-Oligonukleotiden**

*Beads*, beschichtet mit Phosphorothioaten, sind käuflich nicht zu erwerben. Um welche herzustellen, wurden UltraLink<sup>®</sup> Immobilized NeutrAvidin<sup>™</sup> Protein Plus *Beads* mit einem biotinylierten Phosphorothioat-modifizierten (PS)-Oligonukleotid beschichtet. Diese *Beads* haben eine sehr hohe Bindungskapazität ( $\geq 120$  nmol Biotin/ml) und wurden erfolgreich für die Aufreinigung von humaner Telomerase eingesetzt [225].

Je länger die PS-Oligonukleotide sind, umso bessere Hemmeigenschaften besitzen sie [205]. Deshalb wurde ein 20 Basen langes PS-Oligonukleotid mit einer Zufallssequenz gewählt, das am 5'-Ende eine Biotin-Gruppe trägt ( $\beta$ -20n/PS). Es wurde dieselbe Sequenz wie bei Matthes et al. [197] benutzt. Diese Sequenz ist nicht komplementär zur hTR-Sequenz. Als Telomerase-Quelle wurde das HeLa-Zellkernextrakt eingesetzt.

Es gab zwei mögliche Verfahren für die Immobilisierung der Telomerase an die Festphase :

- 1) Hemmung der Telomerase und 2) Bindung des  $\beta$ -20n/PS-Telomerase-Komplexes an die NeutrAvidin<sup>™</sup> Protein Plus *Beads*. Diese Vorgehensweise wurde von Schnapp et al. [225] eingesetzt, um die humane Telomerase mit Hilfe eines Affinitäts-Oligonukleotids, das komplementär zu 14 Basen der hTR ist, an die Festphase zu immobilisieren.
- 1) Beschichtung der NeutrAvidin<sup>™</sup> Protein Plus *Beads* mit  $\beta$ -20n/PS und 2) Bindung der Telomerase an die gebundenen  $\beta$ -20n/PS (Hemmung).

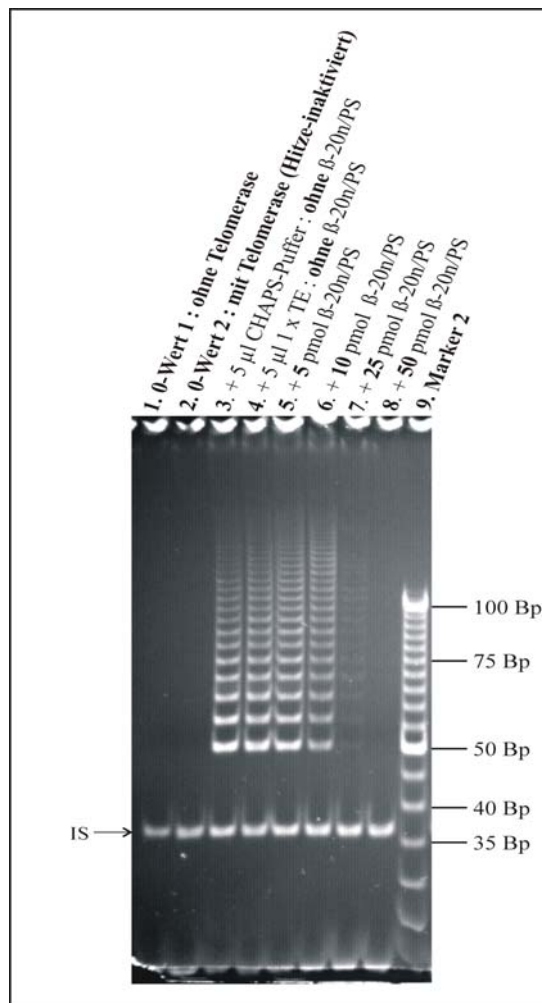


Der Vorteil der ersten Methode war, dass die Bindungsfreiheit im Hemmschritt viel größer wäre, als bei der zweiten. Der Nachteil war, dass durch die Hemmung im ersten Schritt, die zu einem fehlenden Signal im TRAP-Assay führte, nicht entschieden werden konnte, ob die inhibierte Telomerase an die *Beads* gebunden wurde.

Für die Optimierung des Assays war jedoch eine Kontrolle des Versuchverlaufs notwendig. Aus diesem Grund wurden zuerst die *Beads* mit  $\beta$ -20n/PS beschichtet, und dann die Telomerase aus einer Telomerase-haltigen Lösung „herausgefischt“.

#### 3.3.2.1 Bestimmung der benötigten $\beta$ -20n/PS-Menge

Im TRAP-Assay wurde die Konzentration des  $\beta$ -20n/PS bestimmt, die benötigt wurde, um die Telomerase aus 1  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt, das aus ca.  $3,3 \times 10^5$  Zellen hergestellt wurde, zu hemmen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 29** gezeigt. Es wurden zwei Ansätze mit ungehemmter Telomerase mitgeführt. Der eine enthielt 5  $\mu$ l 1xTE-Puffer (Spur 3.), der andere 5  $\mu$ l CHAPS-Puffer (Spur 4.). Da je Ansatz, der  $\beta$ -20n/PS enthielt, 5  $\mu$ l  $\beta$ -20n/PS in 1xTE-Puffer zugegeben wurde, sollte mit dieser Kontrolle überprüft werden, ob der 1xTE-Puffer die Telomerase-Aktivität beeinflusst. Als Vergleich diente der Ansatz mit CHAPS-Puffer, welcher keine Auswirkung auf die Telomerase-Aktivität besitzt.



**Abb. 29:** TRAP-Assay zur Bestimmung der benötigten  $\beta$ -20n/PS-Konzentration. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurde 1  $\mu$ l des HeLa-Zellkernextrakts und die entsprechende Menge  $\beta$ -20n/PS eingesetzt. 1/400 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25  $\mu$ l) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

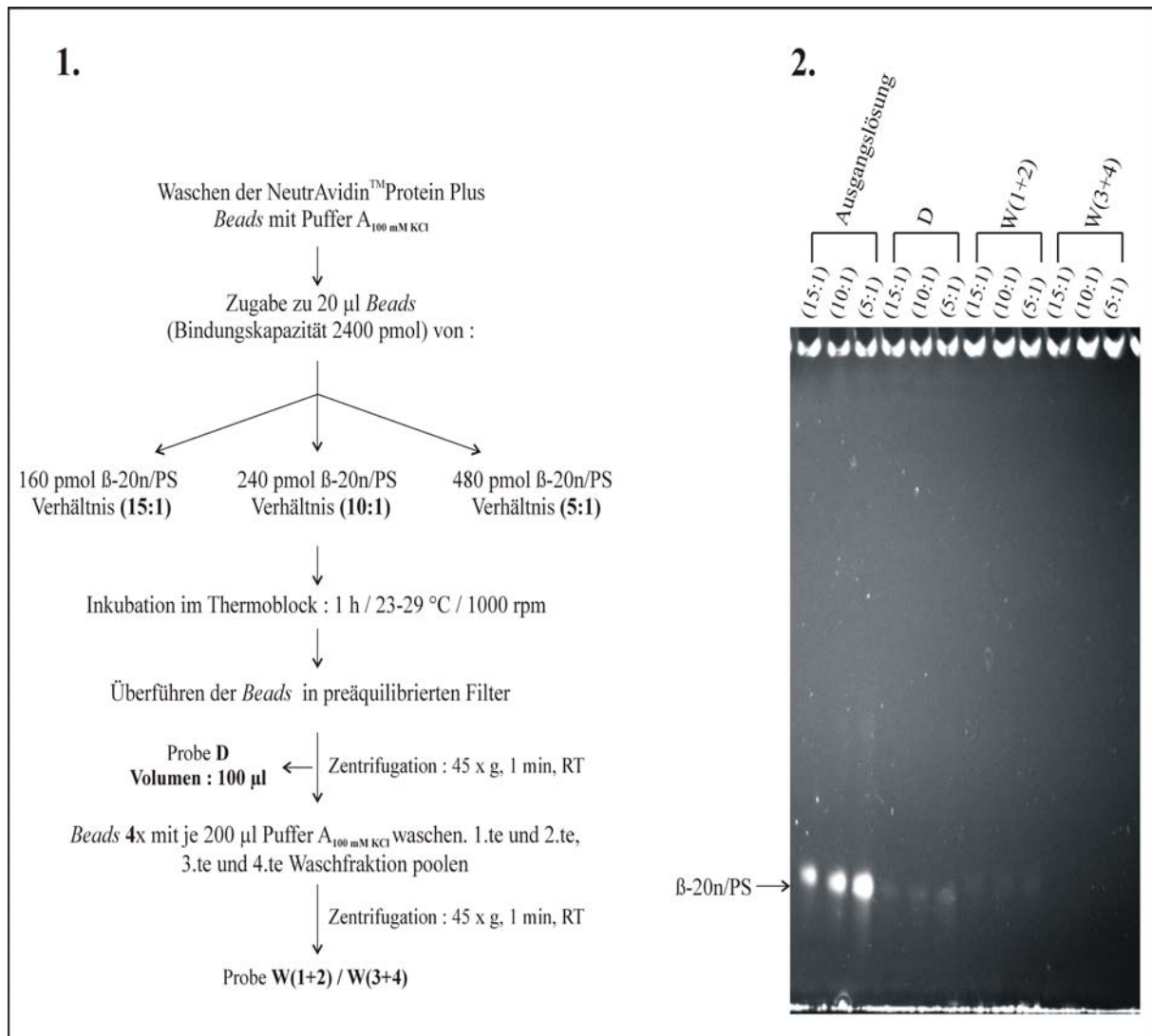
Der 1xTE-Puffer wirkte sich nicht auf die Telomerase-Aktivität aus. Um die Telomerase aus 1  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt effektiv zu hemmen, wurden mind. 50 pmol  $\beta$ -20n/PS benötigt.

### 3.3.2.2 Optimierung der Beschichtung der Beads

Bei der Beschichtung der NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads* mit  $\beta$ -20n/PS wurde festgestellt, dass ein großer Überschuss an Biotin-Bindungsstellen (*Beads*) im Vergleich zu  $\beta$ -20n/PS vorhanden sein muss, um die *Beads* erfolgreich zu beschichten. Es wurden unterschiedliche molare Verhältnisse der *Beads*:  $\beta$ -20n/PS, nämlich (15:1), (10:1) und (5:1), getestet. 20  $\mu$ l

*Beads* besitzen eine theoretische Bindungskapazität von 2400 pmol Biotin, und zu ihnen wurden entsprechend 160, 240 bzw. 480 pmol  $\beta$ -20n/PS zugegeben. Die Bindung fand in Gegenwart von 100 mM KCl statt.

Nach der Inkubation wurden die Durchläufe als auch die Waschfraktionen analysiert. Das Beschichtungsverfahren ist in **Abb. 30** schematisch dargestellt, sowie die Ergebnisse.



**Abb. 30:** 1.: Schematische Darstellung der Beschichtung der NeutrAvidin<sup>TM</sup> Protein Plus *Beads* mit  $\beta$ -20n/PS. 2.: Analyse der Beschichtung der *Beads*. Äquivalente Mengen der Ausgangslösungen, welche zu den *Beads* gegeben wurden, der Durchläufe und der Waschfraktionen wurden auf ein 10 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel (7 M Urea) aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Abkürzungen: **D** : Durchlauf, **W** : Waschfraktion.

Das  $\beta$ -20n/PS wurde bei allen Verhältnissen erfolgreich an die *Beads* gebunden, wobei bei (5:1) ein etwas stärkeres Signal an nicht-gebundenem  $\beta$ -20n/PS aus dem Durchlauf beobachtet wurde als bei (10:1) und (15:1). Für die weiteren Versuche wurde das Verhältnis *Beads* :  $\beta$ -20n/PS von (10:1) ausgewählt.

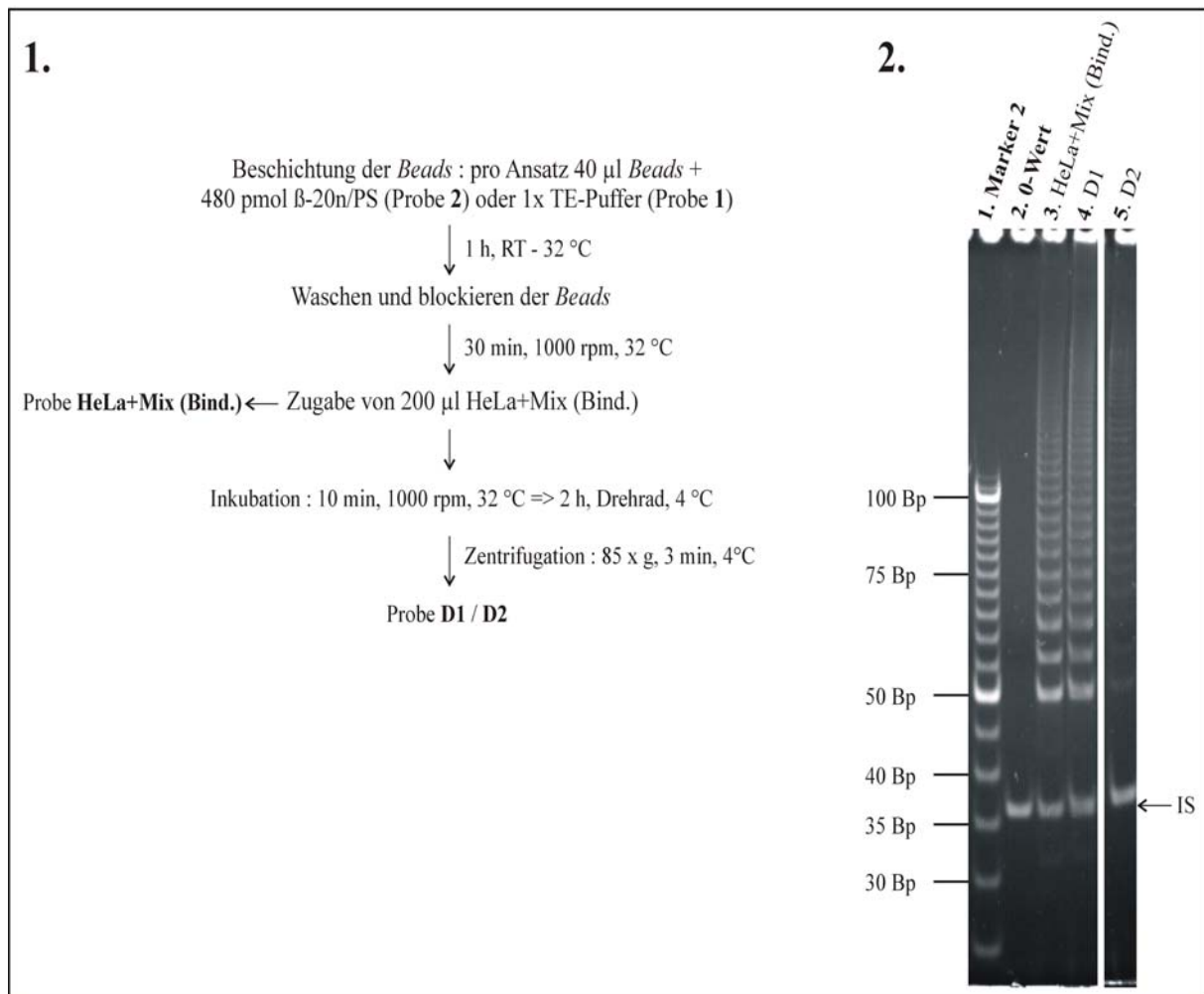
### 3.3.2.3 Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads*

Für die Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads* wurden die Puffer und Bedingungen, welche bei Schnapp et al. [225] veröffentlicht wurden, in modifizierter Form eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden die *Beads* mit  $\beta$ -20n/PS bei einem Verhältnis *Beads* :  $\beta$ -20n/PS von (10:1) beschichtet.  $\beta$ -20n/PS wurde in Mengen zugegeben, welche für die Hemmung der Telomerase, die im nächsten Schritt zugegeben wurde, laut TRAP-Assay (s. 3.3.2.1) ausreichend sein sollten. Die Beschichtung der *Beads* fand bei denselben Bedingungen wie in 3.3.2.2 statt, nur dass das  $\beta$ -20n/PS in einem Volumen von 200  $\mu$ l anstelle von 100  $\mu$ l zugegeben wurde. Als Kontrolle wurden unbeschichtete *Beads*, die anstatt mit  $\beta$ -20n/PS, mit 1xTE-Puffer inkubiert wurden, mitgeführt. Diese Kontrolle sollte zeigen, ob die Telomerase unspezifisch an die *Beads* bindet. Die gewaschenen *Beads* wurden mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub>, der 1 mg/ml BSA, 0,4 mg/ml Lachs-Sperma-DNA und 0,1-0,3 mg/ml Poly(A)-RNA enthielt, abgeblockt. Auf diese Weise sollten unspezifische Protein-, DNA- und RNA-Bindungen an die *Beads* verhindert werden.

Die Bindung der Telomerase an die *Beads* fand in Gegenwart von 100 mM KCl, 0,5% Triton X-100, 5,4  $\mu$ g/ml Lachs-Sperma-DNA und 0,15 mg/ml Poly(A)-RNA statt.

Das Bindungsverfahren ist in dem Fließdiagramm in **Abb. 31-1.**, die Ergebnisse in **Abb. 31-2.** gezeigt.



**Abb. 31:** **1.:** Schematische Darstellung der Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads*. HeLa+Mix (Bind.) stellt die Telomerase-haltige Ausgangslösung dar, welche mit den beschichteten *Beads* inkubiert wurde. Sie enthielt 9,6  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt pro 200  $\mu$ l Lösung. **2.:** TRAP-Assay mit den Fraktionen HeLa+Mix (Bind.) und D. Der 0-Wert enthielt Puffer  $A_{\text{ohne KCl, ohne TX}}$ . Die Probe HeLa+Mix (Bind.) wurde bei dem Schritt 10 min / 32 °C mitinkubiert. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden äquivalente Mengen der (1:10)-verdünnten Proben eingesetzt. 1/20 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25  $\mu$ l) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abkürzungen: **D** : Durchlauf.

Die Telomerase wurde effektiv an die  $\beta$ -20n/PS-beschichteten *Beads* gebunden und im Durchlauf (s. Spur **5.** in **Abb. 31-2.**) wurde nur eine sehr schwache Aktivität gemessen. In der Kontrolle (unbeschichtete *Beads*) wurde das Enzym hauptsächlich in dem Durchlauf detektiert (s. Spur **4.** in **Abb. 31-2.**).

### 3.4 Nachweis der Telomerase mit Phosphorothioat-modifizierten (PS) Oligonukleotiden und Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Der Assay zum Nachweis der humanen Telomerase wurde mit den Erfahrungen aus 3.1-3.3 in seiner Endform in folgenden Schritten durchgeführt :

1. Bindung der Telomerase an *Beads*, beschichtet mit  $\beta$ -20n/PS. In diesem Schritt wird die Telomerase an ihrer Protein-Untereinheit (hTERT) gebunden. Zusammen mit der Telomerase werden die Heparin-bindenden Proteine an die *Beads* immobilisiert.
2. Spezifischer Nachweis der Telomerase-RNA (hTR) aus dem Telomerase-Molekül. Von den *Beads* wird RNA isoliert und mittels RT-PCR die hTR nachgewiesen.

#### 3.4.1 Optimierung der Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads*

Der erste Schritt des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase, die Bindung der Telomerase an die *Beads*, wurde weiter optimiert. Die Beschichtung der *Beads* wurde nach dem Verfahren in 3.3.2.2 durchgeführt, wobei mehr *Beads* mitgeführt wurden, um eine noch effektivere Bindung der Telomerase als in 3.3.2.3 zu erreichen. Die Waschschrte wurden auch modifiziert. Die vier Waschschrte, die zum Entfernen von Resten ungebundener  $\beta$ -20n/PS dienten, wurden nicht mit Puffer A<sub>100 mM KCl</sub>, sondern mit Puffer A<sub>100mM KCl</sub>, der 0,5% Triton X-100 enthielt (entspricht Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5% TX</sub>), durchgeführt. Auf diese Weise wurden die *Beads* für die nächsten Versuchsschrte äquilibriert.

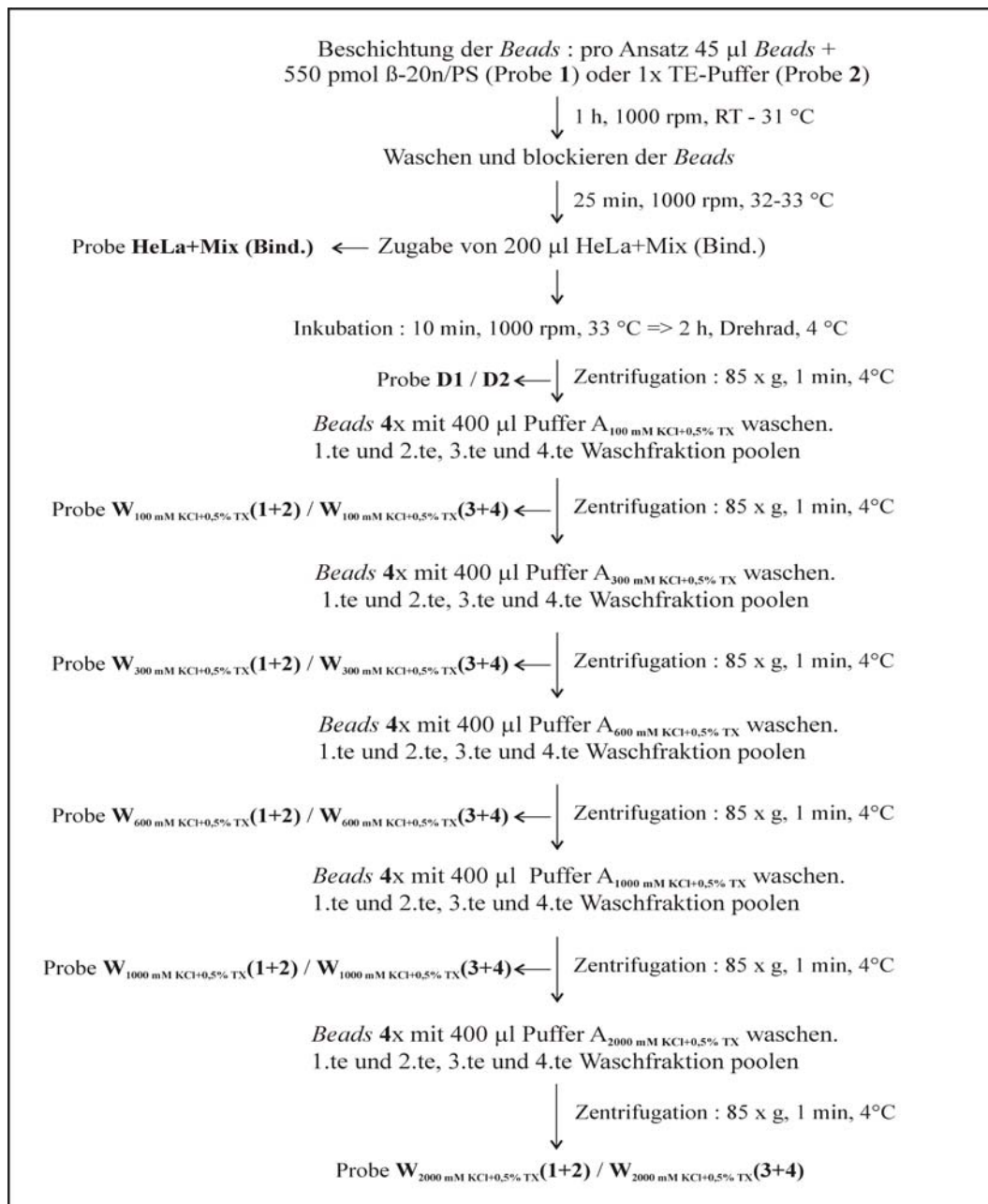
Es wurden wieder unbeschichtete *Beads* mitgeführt. Dies war eine Kontrolle für die unspezifische Bindung der Telomerase an die *Beads*, und sollte zeigen, ob sich das Enzym auswaschen lässt, falls es unspezifisch gebunden wird.

Zum Blockieren der *Beads* wurde der Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5% TX</sub> eingesetzt, welcher mit 1 mg/ml BSA, 0,4 mg/ml Lachs-Sperma-DNA und 0,3 mg/ml Poly(A)-RNA versetzt wurde.

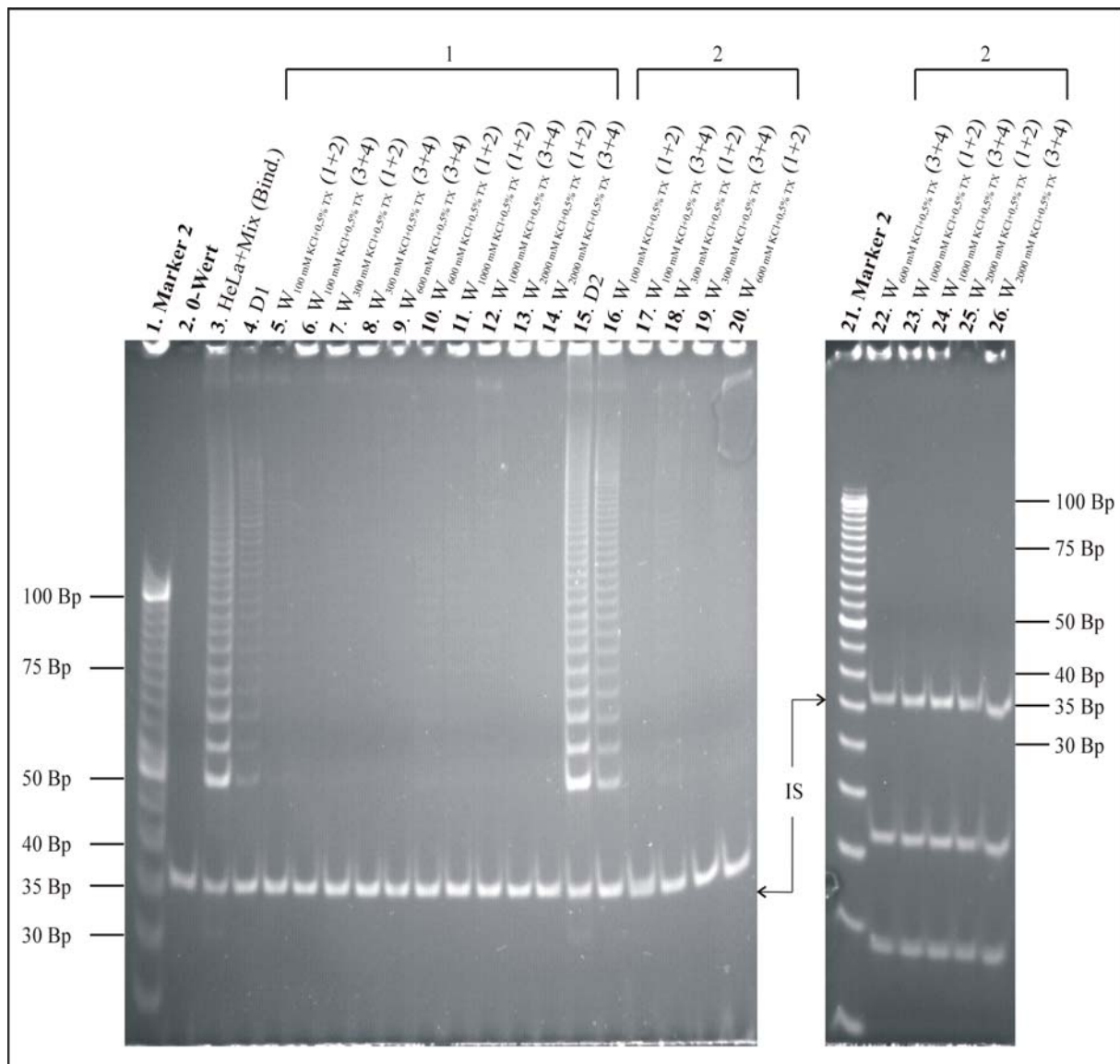
Die Telomerase (Quelle : HeLa-Zellkernextrakt) wurde an die beschichteten bzw. unbeschichteten, abgeblockten *Beads* gebunden. Die Bindung fand unter 100 mM KCl, 0,5% Triton X-100, 5,5  $\mu$ g/ml Lachs-Sperma-DNA und 0,15 mg/ml Poly(A)-RNA statt. Pro Ansatz (45  $\mu$ l *Beads*) wurde Telomerase aus 9,6  $\mu$ l HeLa-Zellkernextrakt (entspricht ca.  $3,2 \times 10^6$  Zellen) gebunden.

Mit Puffern, welche steigende Konzentrationen von KCl (300 / 600 / 1000 / 2000 mM : Puffer A<sub>300-2000</sub> mM KCl+0,5% TX) und 0,5% Triton X-100 enthielten, wurde nach der Inkubation der Telomerase mit den *Beads*, gewaschen.

Die Bindung der Telomerase an die *Beads* ist in **Abb. 32** schematisch dargestellt, und in **Abb. 33** sind die Ergebnisse gezeigt.



**Abb. 32:** Schematische Darstellung der optimierten Bindung der Telomerase an die *Beads*. Die Lösung HeLa+Mix (Bind.) enthielt 9,6 µl HeLa-Zellkernextrakt pro 200 µl Lösung. Sie entsprach der oben beschriebenen Lösung, in der die Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads* stattfand. Abkürzungen: **D** : Durchlauf, **W** : Waschfraktion.



**Abb. 33:** TRAP-Assay mit den unterschiedlichen Fraktionen im optimierten Bindungsverfahren der Telomerase an die beschichteten Beads. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden äquivalente Mengen der (1:10)-verdünnten Proben eingesetzt. Der 0-Wert enthielt Puffer  $A_{\text{ohne KCl, ohne TX}}$ . 1/4 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurden in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25  $\mu$ l) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

Obwohl die *Beads* mit  $\beta$ -20n/PS-Mengen beschichtet wurden, die für die vollständige Hemmung der Telomerase ausreichen sollten, wurde in D1 eine schwache Telomerase-Aktivität gefunden. Es wurde keine dauerhafte, unspezifische Bindung der Telomerase an den unbeschichteten *Beads* beobachtet. D2 enthielt den Hauptanteil an Telomerase, Reste von Aktivität wurden in den Waschfraktionen detektiert.



Die spezifisch an die beschichteten *Beads* gebundene Telomerase wurde mit aufsteigender KCl-Konzentration nicht von den *Beads* eluiert. Dieses Ergebnis erlaubte das Waschen der *Beads* mit hohen KCl-Konzentrationen (Puffer A<sub>300-600</sub> mM KCl+0,5% TX bzw. A<sub>300-2000</sub> mM KCl+0,5% TX), welche zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Komponenten führen. Im weiteren Verlauf wurde nach dem letzten Waschschrift 2x mit 1x TE-Puffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt sollte eventuell gebundene Nukleinsäuren, die bei den vorhergehenden Waschschriften nicht entfernt wurden, von den *Beads* lösen.

Im zweiten Schritt des Telomerase-Assays wurde aus den *Beads*, an denen die Telomerase gebunden wurde, RNA isoliert. Dabei wurde aus der Kontrolle (unbeschichtete *Beads*) ein hTR-Signal detektiert. Dieses Signal könnte durch Reste unspezifisch gebundener Telomerase oder gebundener freier hTR bedingt sein. Genomische DNA kann nicht der Grund dafür sein, da vor der RT-PCR ein DNaseI-Verdau durchgeführt wurde.

Die dargestellten Ergebnisse, sowie zusätzliche Versuche führten zusammenfassend zu folgenden Änderungen der Versuchsbedingungen für den Telomerase-Assay :

- Da in D1 Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (s. **Abb. 33**), wurden in den weiteren Versuchen mehr beschichtete *Beads* und weniger Telomerase eingesetzt, um eine quantitative Bindung der Telomerase zu erreichen.
- Die Inkubationszeit der Telomerase mit den beschichteten *Beads* bei 4°C wurde von 2 h auf 1 h, die sich als ausreichend erwies, verkürzt.
- Es wurde eine Vorinkubation (Vorfiltration) eingeführt. Bei der Vorinkubation wurde die Telomerase-haltige Lösung **vor** der Inkubation mit den beschichteten *Beads*, mit BSA-abgeblockten, unbeschichteten *Beads* inkubiert. Ziel dieser Vorinkubation war es die freien Nukleinsäuren zu binden. Der Durchlauf dieser Vorinkubation wurde mit den beschichteten *Beads*, die mit BSA, Lachs-Sperma-DNA und Poly(A)-RNA abgeblockt wurden, inkubiert. Die Inkubation wurde in Gegenwart von 4,3-5,5 µg/ml Lachs-Sperma-DNA und 0,15-0,3 mg/ml Poly(A)-RNA durchgeführt. Bei der Inkubation sollten **keine** freien Nukleinsäuren, falls welche nach der Vorinkubation vorhanden sein sollten, an die *Beads* binden. Die Zeit und die Bedingungen für die Vorinkubation und die Inkubation

waren dieselben. Die in der Vorinkubation eingesetzten *Beads* wurden mit 1 mg/ml BSA in Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5% TX</sub> abgeblockt (Blockierpuffer 1), während die *Beads* für die Inkubation mit Blockierpuffer 2 (1 mg/ml BSA, 0,4 mg/ml Lachs-Sperma-DNA und 0,3 mg/ml Poly(a)-RNA in A<sub>100 mM KCl+0,5% TX</sub>) behandelt wurden.

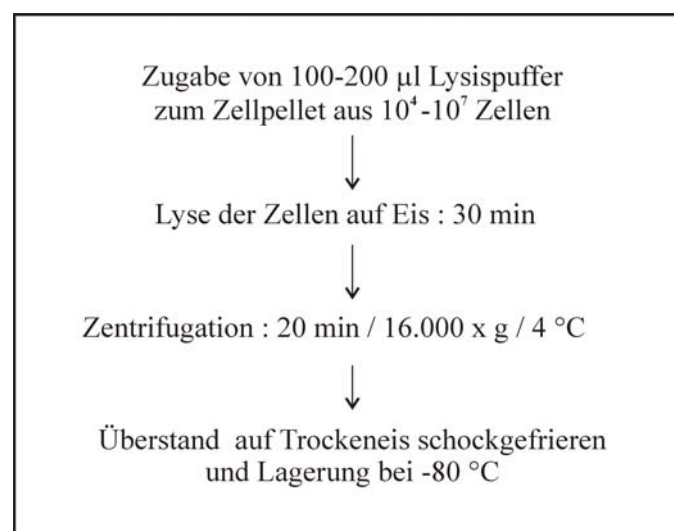
- Die Anzahl der Waschschrte wurde reduziert. Anstelle von vier wurden zwei Waschschrte mit Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5% TX</sub> durchgeführt, da Telomerase-Aktivität nur in den ersten beiden Waschschrten detektiert wurde. Die Waschschrte mit 300-1000 mM KCl-haltigem Puffer wurden durch einen Waschschrte (4x) mit Puffer A<sub>2000 mM KCl+0,5% TX</sub> ersetzt.

### 3.4.2 Telomerase-Assay mit Zelllysaten und Ermittlung der Nachweisgrenze der entwickelten Methode

Für die Endoptimierung des Telomerase-Assays wurde als Telomerase-Quelle die Telomerase-reiche Jurkat-Zelllinie eingesetzt.

#### 3.4.2.1 Herstellung der Jurkat-Lysate und Telomerase-Assay mit den neuen Bedingungen

Das Lysat wurde, basierend auf den Angaben im TRAPeze<sup>®</sup> Telomerase Detection Kit, nach einem modifizierten Protokoll hergestellt. Die Zellen wurden mit dem CHAPS-Puffer aus dem Kit, sowie mit dem Puffer A<sub>ohne KCl</sub>+0,5% TX aufgeschlossen. Mit beiden Puffern gelang ein effektiver Aufschluss unter Erhalt der Telomerase-Aktivität. Schematisch ist die Lysat-Herstellung in **Abb. 34** dargestellt.

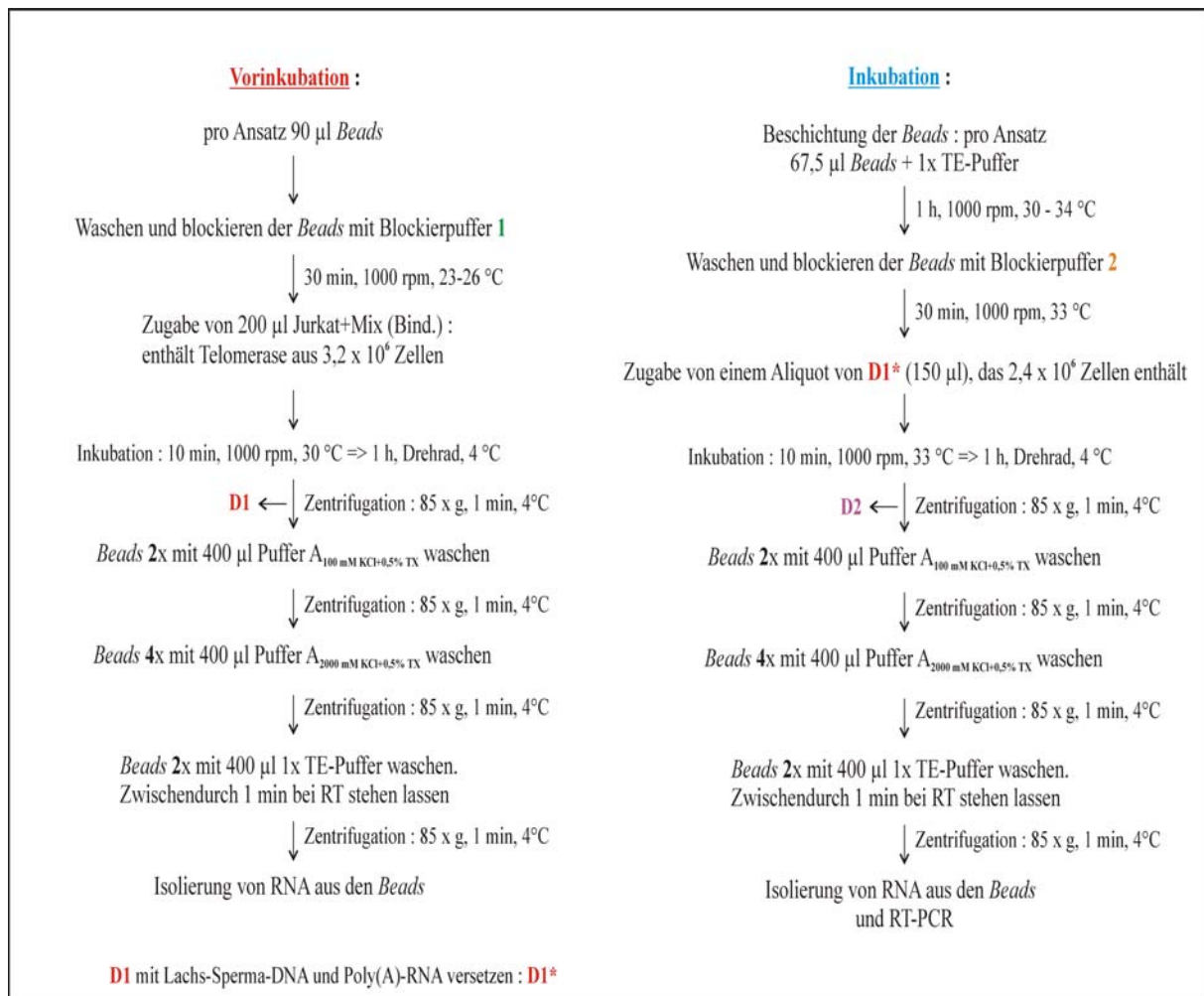


**Abb. 34:** Schematische Darstellung der Herstellung der Jurkat-Zelllysate.

Die Lysate wurden in dem Telomerase-Assay mit den neuen Bedingungen eingesetzt. In diesem Assay wurden die in **3.4.1** beschriebenen Änderungen der Versuchsbedingungen eingefügt. Der Assay wurde nur mit der Kontrolle, d.h. nur mit unbeschichteten *Beads* in der Inkubation, durchgeführt. Hiermit sollte getestet werden, ob unter den neuen Bedingungen die *Beads* so gut geblockt und nach der Inkubation gewaschen sind, dass sie keine unspezifische Protein-/Nukleinsäurebindungen mehr eingehen bzw. solche ausgewaschen werden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, falls die freie hTR die Ursache für das oben

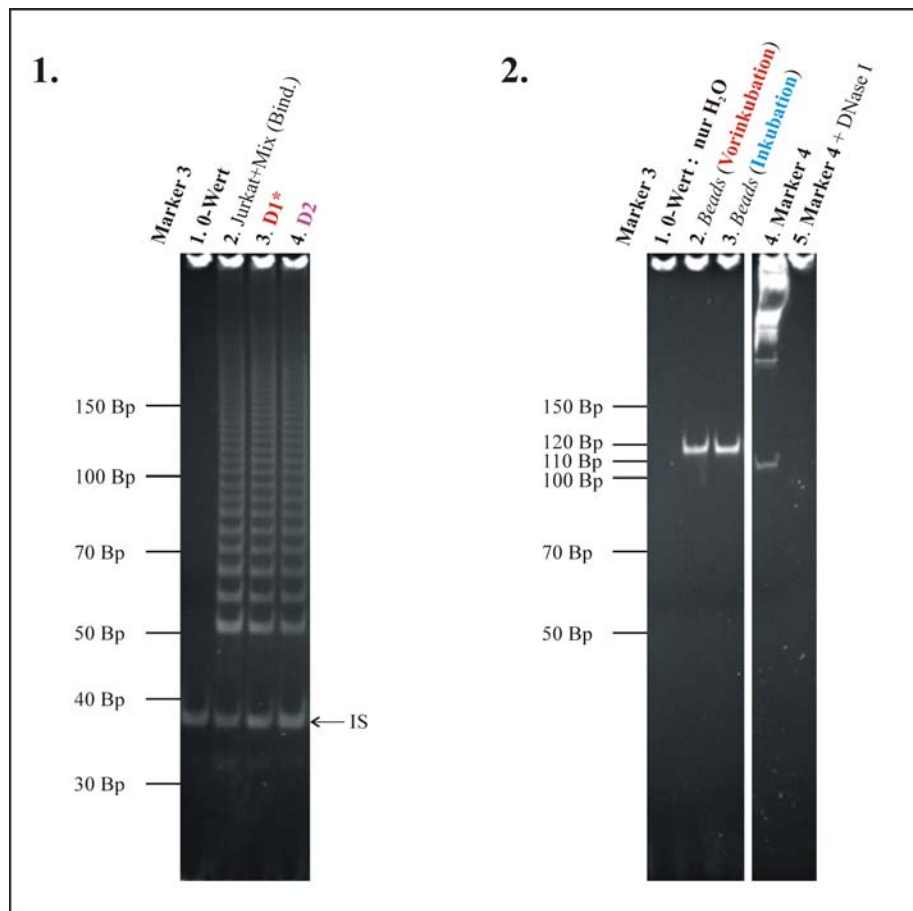
beschriebene Signal aus der Kontrolle war, ob sie mit Hilfe der Vorfiltration vollständig aus der Telomerase-haltigen Probe entfernt werden kann.

Das Fließdiagramm für den Telomerase-Assay ist in **Abb. 35**, in **Abb. 36** sind die Ergebnisse (TRAP-Assay mit unterschiedlichen Fraktionen und RT-PCR mit der isolierten RNA) gezeigt.



**Abb. 35:** Schematische Darstellung des Telomerase-Assays mit den neuen Versuchsbedingungen. Die Lösung Jurkat+Mix (Bind.) ist die Ausgangslösung, welche eingesetzt wurde. Die Telomerase-Quelle war das CHAPS-Lysat. Abkürzungen: **D** : Durchlauf, **BSA** : Rinderserumalbumin.

Die RT-PCR wurde in dieser Arbeit in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde mit der isolierten RNA nach DNaseI-Verdau eine cDNA-Erststrangsynthese mit Hilfe von *Random Hexamer Primer* durchgeführt (Reverse-Transkriptase-Reaktion). Ein Aliquot dieser cDNA wurde in den zweiten Schritt, in die PCR, eingesetzt.



**Abb. 36:** 1.: TRAP-Assay mit Fraktionen des Telomerase-Assays. Der TRAP-Assay wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt (Telomerase-Reaktion) wurden je 2 µl der Proben eingesetzt. Der 0-Wert enthielt Puffer A<sub>100 mM KCl+0,5% TX</sub>. 1/120 der Telomerase-Reaktions-Ansätze wurde in den zweiten Schritt (PCR) gegeben, und die ganzen PCR-Ansätze (25 µl) auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. 2.: RT-PCR mit der RNA, isoliert aus den *Beads*. Je 3/40 der isolierten RNA wurden in die Reverse-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. 1/10 der Reverse-Transkriptase-Ansätze wurden in die PCR gegeben. Die PCR-Ansätze (25 µl) wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Auf das Gel wurden auch die Kontrollen für den DNaseI-Verdau aufgetragen. Als Kontrolle wurde 0,5 µg Marker 4 verdaut, und zum Vergleich wurde dieselbe Menge von Marker 4 auf dem Gel mitgeführt.

Trotz Vorinkubation der Telomerase-haltigen Lösung mit unbeschichteten, BSA-abgeblockten *Beads*, wurde eine Bande in der Kontrolle (s. Spur 3. in 2.) beobachtet (Hintergrund).

Dies zeugte dafür, dass falls die Ursache für dieses Signal die freie hTR war, die *Beads* in der Vorfiltration „überladen“ wurden, d.h. dass die freie hTR in der Vorinkubation nicht vollständig adsorbiert werden konnte, und auf diese Weise in den Inkubationsschritt gelang. Um dies zu umgehen, war es notwendig die eingesetzte Zellzahl weiter zu verringern. Wenn jedoch eine unspezifische Bindung der Telomerase der Grund dafür war, dann sollte durch

stringentere Bindungsbedingungen versucht werden, dies zu unterbinden. Hierzu sollte die Bindung der Telomerase nicht in Gegenwart von 100 mM, sondern von 1000 mM (1 M) KCl stattfinden. Da vor jeder reversen Transkription in dieser Arbeit, ein DNaseI-Verdau mit der isolierten RNA durchgeführt wurde, kann dieses Signal nicht auf Spuren von genomischer DNA hinweisen.

Als Telomerase-Quelle für die weiteren Versuche wurden die hochaktiven Zelllysate, welche mit den eigenen Triton X-100-haltigen Puffern hergestellt wurden, eingesetzt.

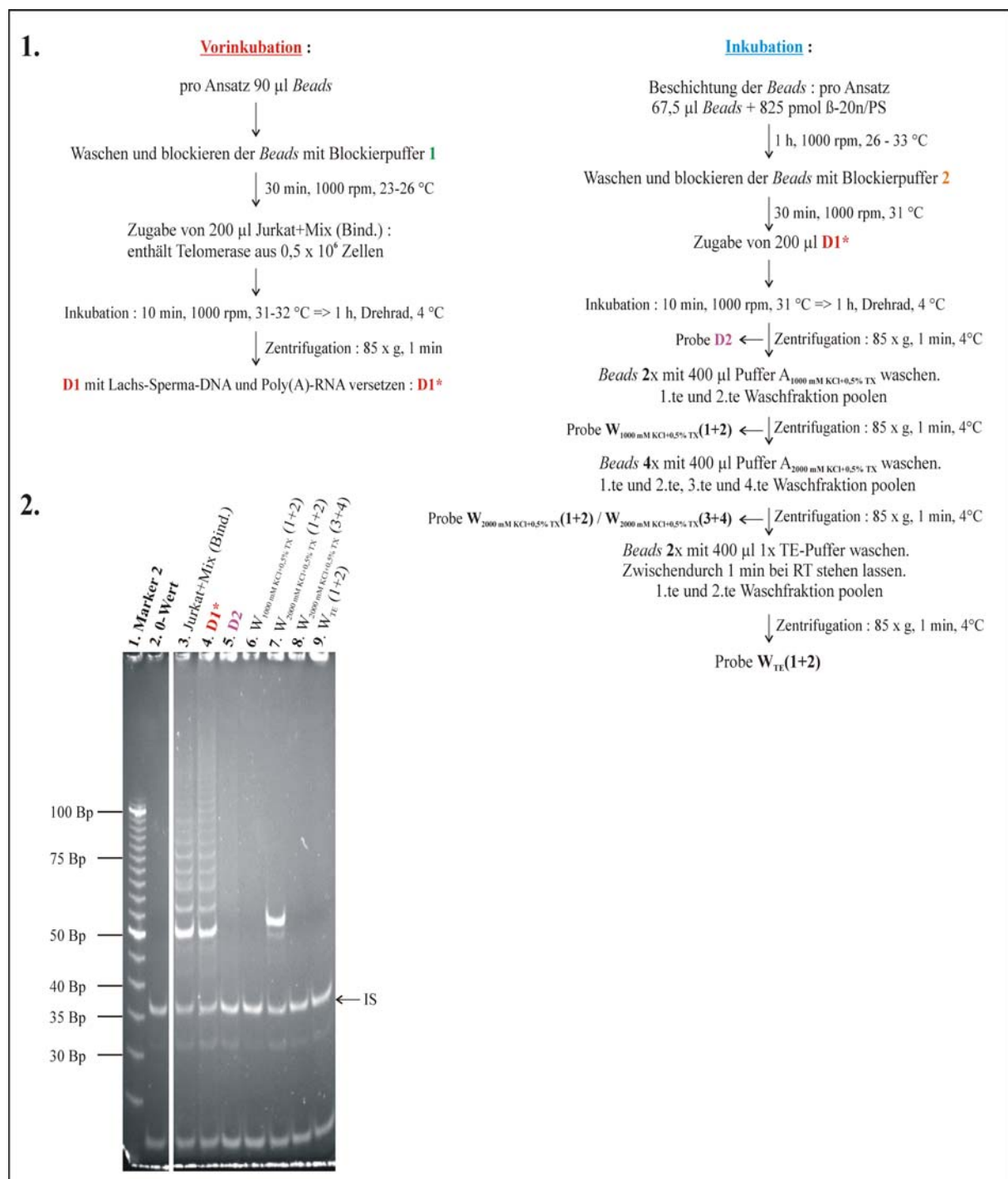
#### 3.4.2.2 Bindung der Telomerase an die beschichteten Beads unter 1 M KCl

Durch die Erhöhung der KCl-Konzentration auf 1 M während der Vorinkubation und Inkubation, sollten unspezifische Bindungen an die *Beads* weiter reduziert werden. In **Abb. 37-1.** ist das neue Bindungsverfahrens schematisch dargestellt.

Bei der Analyse wurde ein direkter Hot Start TRAP-Assay eingesetzt. Dieser Assay wurde als Ein-Schritt-Reaktion durchgeführt, und hier wurde anstelle von einer normalen *Taq* DNA Polymerase eine Hot Start *Taq* DNA Polymerase eingesetzt, welche die Bildung von unspezifischen PCR-Nebenprodukten unterdrückt.

Der Vorteil dieses Assays war, dass die Telomerase-Reaktion und die PCR in einem Reaktions-Mix stattfanden. Dadurch konnten auch Proben mit geringer Aktivität analysiert werden. Hier wurden alle von der Telomerase verlängerten Einzelstränge amplifiziert im Gegensatz zu der Zwei-Schritt-Reaktion (Trennung der Telomerase-Reaktion von der PCR), bei der nur ein Teil der Einzelstränge in die PCR eingesetzt wurde.

Die Ergebnisse des Hot Start TRAP-Assays sind in **Abb. 37-2.** wiedergegeben.

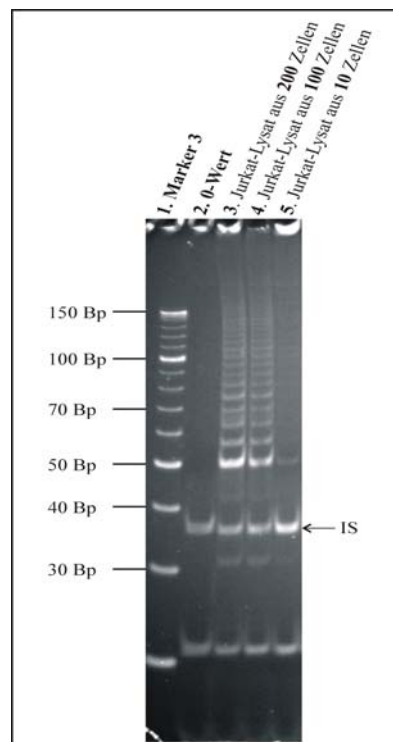


**Abb. 37: 1.:** Schematische Darstellung der Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads* in Gegenwart von 1 M KCl. Die Lösung Jurkat+Mix (Bind.) hatte eine Konzentration von 1 M KCl. Blockierpuffer 1 enthielt nur BSA, Blockierpuffer 2 enthielt BSA, Poly(A)-RNA und Lachs-Sperma-DNA. Abkürzungen: **D** : Durchlauf, **W** : Waschfraktion. **2.:** Direkter Hot Start TRAP-Assay mit den unterschiedlichen Fraktionen. In dem Assay wurden je 2  $\mu$ l der Proben, welche vorher (1:10) mit Puffer A<sub>ohne KCl+0,5% TX</sub> verdünnt wurden, eingesetzt. Der 0-Wert enthielt 2  $\mu$ l Puffer A<sub>ohne KCl+0,5% TX</sub>. Die ganzen Ansätze (25  $\mu$ l) wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

Die Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads* erfolgte unter 1 M KCl erfolgreich. Unter den neuen Bindungsbedingungen wurde die Telomerase vollständig an die beschichteten *Beads* gebunden, und später nicht ausgewaschen. Bei der Bande in Spur 7. handelt es sich wahrscheinlich um ein unspezifisches Nebenprodukt der PCR.

#### 3.4.2.3 Assay zum Nachweis der humanen Telomerase in seiner Endversion

In der optimierten Endversion des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase wurde als Telomerase-Quelle wieder das Jurkat-Zelllysate, das nach dem Fließdiagramm aus **Abb. 34** mit Puffer A<sub>ohne KCl+0,5% TX</sub> hergestellt wurde, eingesetzt. Im Hot Start TRAP-Assay wurde Jurkat-Lysat äquivalent zu 10, 100 bzw. 200 Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 38** wiedergegeben und zeigen, dass das hergestellte Jurkat-Lysat eine sehr hohe Telomerase-Aktivität besaß.

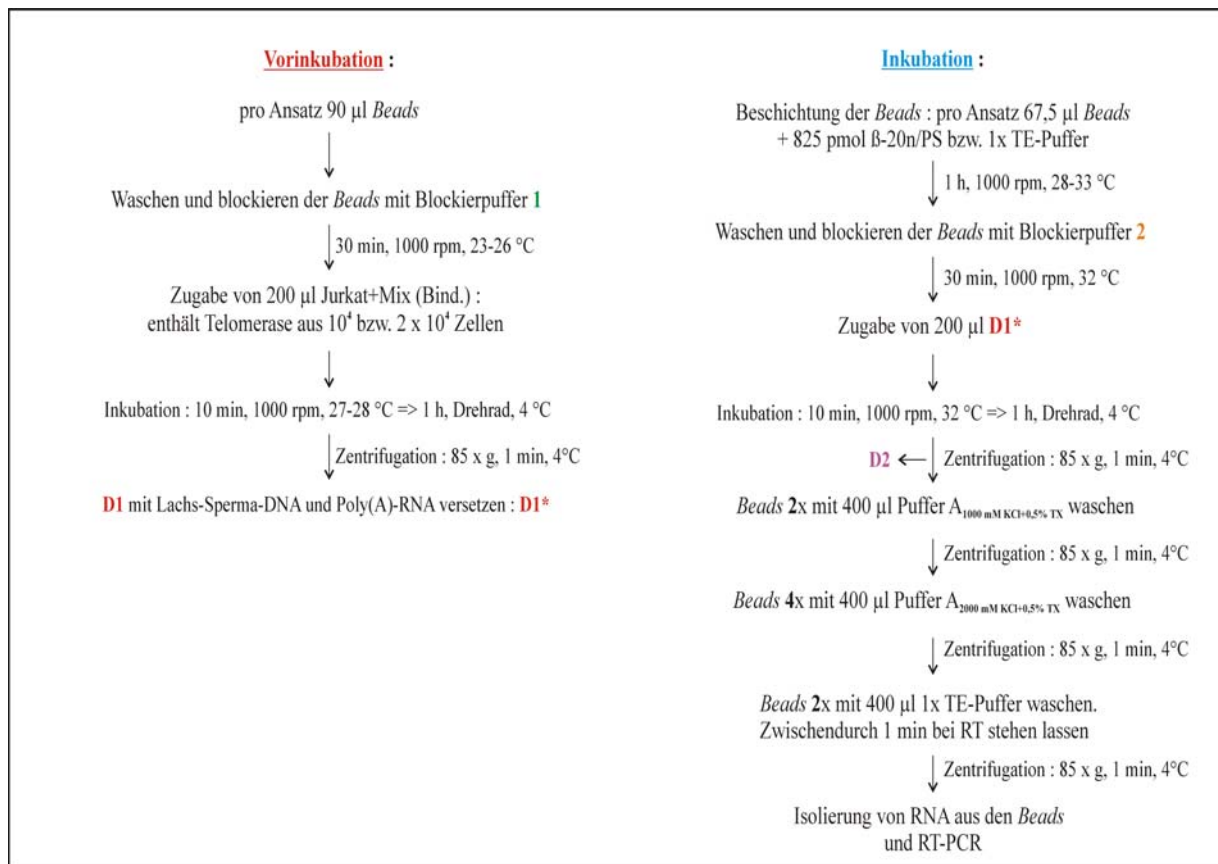


**Abb. 38:** Direkter Hot Start TRAP-Assay mit dem Jurkat-Lysat. In dem Assay wurden je 2 µl des (1:50)-, (1:100)- bzw. (1:1000)-verdünnten Zelllysats, die Jurkat-Lysat aus 10, 100 bzw. 200 Zellen entsprachen, eingesetzt. Der 0-Wert enthielt 2 µl Puffer A<sub>ohne KCl+0,5% TX</sub>. Die ganzen Ansätze (25 µl) wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Telomerase-Assay wurde in seiner optimierten Endversion nach dem Fließdiagramm in **Abb. 39** durchgeführt. Die Jurkat+Mix (Bind.)-Ausgangslösung, die  $10^4$  Zellen enthält, hat



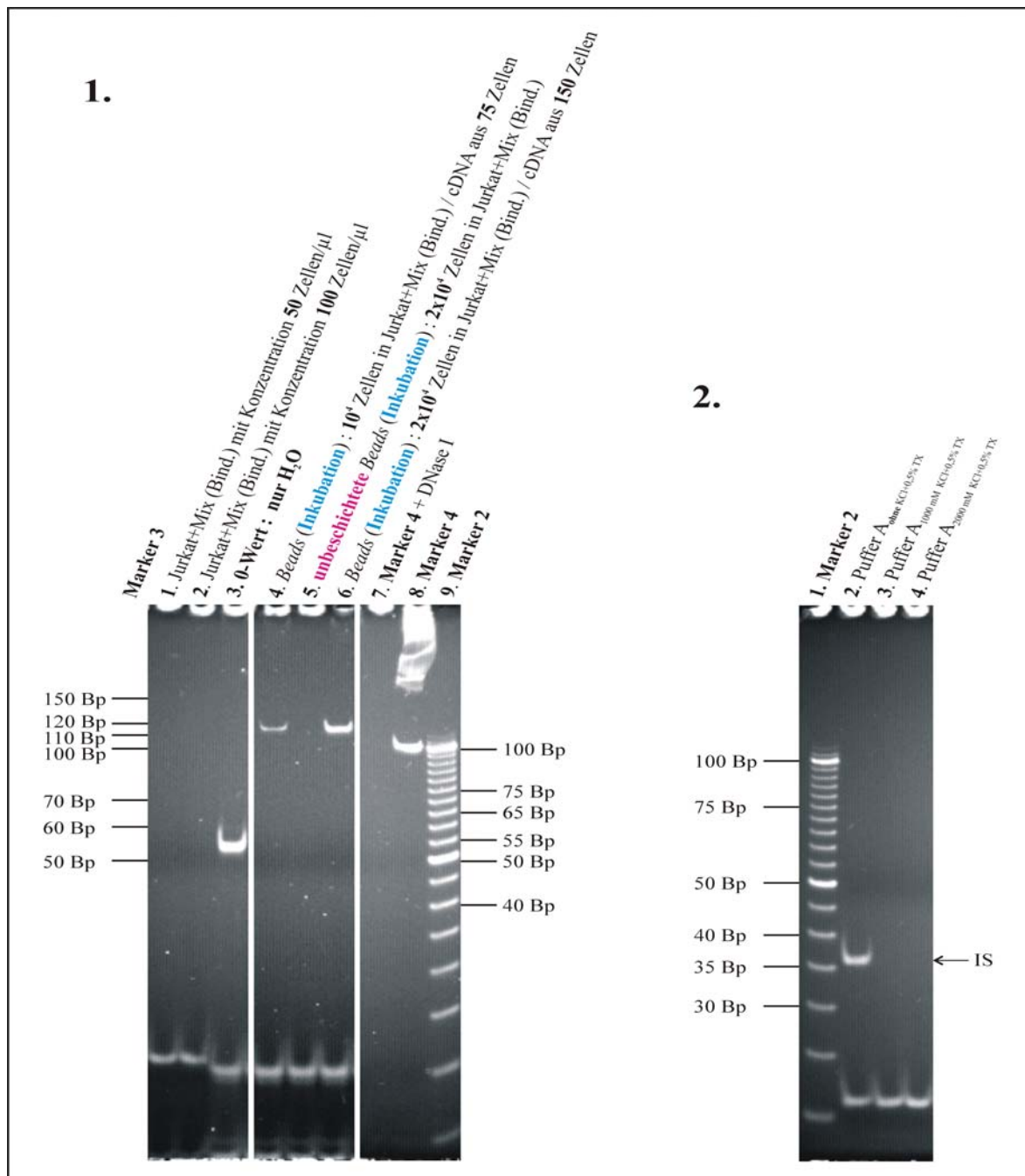
eine Konzentration von 50 Zellen/ $\mu\text{l}$ , die andere, welche  $2 \times 10^4$  Zellen enthält, eine Konzentration von 100 Zellen/ $\mu\text{l}$ . Es wurden nur zu der Probe mit der höchsten Zellzahl in der Ausgangslösung ( $2 \times 10^4$  Zellen) unbeschichtete *Beads* als Hintergrund-Kontrolle mitgeführt.



**Abb. 39:** Schematische Darstellung des Telomerase-Assays in der Endversion. Die Bindung fand in Gegenwart von 1 M KCl statt. Blockierpuffer 1 enthielt nur BSA, Blockierpuffer 2 enthielt BSA, Poly(A)-RNA und Lachs-Sperma-DNA. Abkürzungen: **D** : Durchlauf, **W** : Waschfraktion.

Die Ergebnisse des Telomerase-Assays mit dem Jurkat-Lysat aus **Abb. 38** sind in **Abb. 40-1** gezeigt. Für die Auswertung der Telomerase-Aktivität kam nur der direkte Hot Start TRAP-Assay in Frage, da die Lösungen (Jurkat+Mix (Bind.), D, W) /  $\mu\text{l}$  nur sehr wenig Telomerase-Aktivität enthielten. Zusätzlich wurde ein direkter Hot Start TRAP-Assay mit den im Assay eingesetzten Puffern durchgeführt (s. **Abb. 40-2**).

In der RT-PCR wurde bei der Probe, welche  $10^4$  Zellen in der Ausgangslösung Jurkat+Mix (Bind.) enthielt, in der PCR ein cDNA-Aliquot, das der cDNA aus 75 Zellen entsprach, eingesetzt. Bei der Probe, die  $2 \times 10^4$  Zellen enthielt, wurde in die PCR ein cDNA-Aliquot, äquivalent zur cDNA aus 150 Zellen, zugegeben.



**Abb. 40:** 1.: Direkter Hot Start TRAP-Assay mit Assay-Fractionen (Spur 1.-2.) und RT-PCR mit der isolierten RNA (Spur 3.-6.). 2  $\mu$ l der Jurkat+Mix (Bind.)-Proben wurden in den Hot Start TRAP-Assay eingesetzt. Je 3/40 der isolierten RNA wurden in die Reverse-Transkriptase-Reaktion eingesetzt, 1/10 der Reverse-Transkriptase-Ansätze wurden in die PCR gegeben. Auf das Gel wurden auch die Kontrollen für den DNaseI-Verdau aufgetragen (Spur 7.-8.). Als Kontrolle wurde 0,5  $\mu$ g Marker 4 verdaut, und zum Vergleich wurde dieselbe Menge von Marker 4 auf dem Gel mitgeführt. 2.: Direkter Hot Start TRAP-Assay mit den Puffern aus dem Telomerase-Assay. Je 2  $\mu$ l der Puffer A<sub>ohne KCl+0,5% TX</sub>, A<sub>1000 mM KCl+0,5% TX</sub> und A<sub>2000 mM KCl+0,5% TX</sub> wurden in dem Hot Start TRAP-Assay eingesetzt. 25  $\mu$ l der PCR-Ansätze (Hot Start TRAP-Assay sowie RT-PCR) wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese aufgetrennt.

Der Nachteil des direkten Hot Start TRAP Assays war, dass Proben, welche viel KCl enthielten, nicht analysiert werden konnten, da der hohe KCl-Gehalt die PCR hemmte. Dies zeigen Spuren **3.** und **4.** in **Abb. 40-2.**, in denen der IS fehlt, sowie Spuren **1.** und **2.** in **Abb. 40-1.**, in denen weder der IS, noch die charakteristische Produkt-Leiter zu sehen ist. Spur **1.** und **2.** in **Abb. 40-1.** enthielten pro Ansatz Telomerase aus derselben Anzahl Zellen, wie Spur **4.** und **3.** in **Abb. 38**, nur dass in dem Hot Start TRAP-Assay in **Abb. 38** die Proben eine KCl-Endkonzentration von 63 mM besaßen, während die in **Abb. 40-1.** eine von 143 mM KCl.

Bei der Bande in Spur **3.** in **Abb. 40-1.**, die zwischen 50 und 60 Bp läuft, handelt es sich um ein Nebenprodukt der PCR. Dieses unspezifische Produkt, das selten beobachtet wurde, stört die Analyse nicht, da es von dem eigentlichen Produkt klar zu unterscheiden ist.

In den bisher beschriebenen Assays zum Nachweis der humanen Telomerase aus **3.4**, sowie in den Versuchen aus **3.3.2** wurde die Einstellung der Proben immer nach Zellzahl gemacht. Wenn  $\leq 2 \times 10^4$  Zellen in die Ausgangslösung Jurkat+Mix (Bind.) des Telomerase-Assays in seiner Endversion (**Abb. 39**) bzw. cDNA aus der isolierten RNA, äquivalent zu cDNA aus  $\leq 150$  Zellen, in die PCR eingesetzt wurde, dann wurde **kein** Hintergrund detektiert, jedoch ein starkes Signal aus den beschichteten *Beads*. Mit der entwickelten Methode gelang der erfolgreiche Nachweis von **75** Zellen.

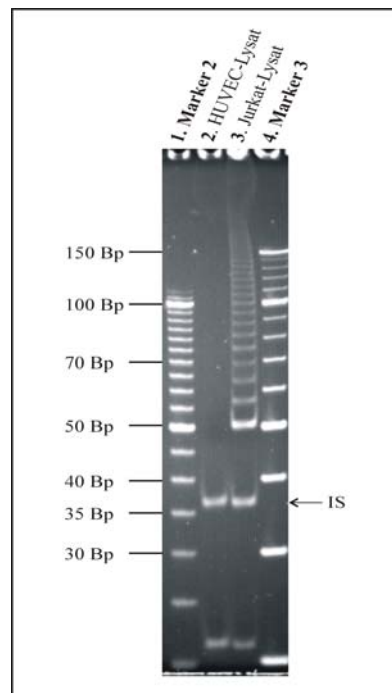
In **Tabelle 9** ist eine Zusammenfassung von getesteten Verhältnissen und erzielten Ergebnissen gegeben :

Zellzahl in Jurkat+Mix (Bind.)	Zellzahl in cDNA-Herstellung	Zellzahl in PCR	Signal	Hintergrund
<b>1 x 10<sup>4</sup></b>	<b>750</b>	<b>75</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>
<b>1 x 10<sup>4</sup></b>	<b>750</b>	<b>75</b>	<b>ja</b>	
<b>2 x 10<sup>4</sup></b>	<b>1500</b>	<b>150</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>
<b>1 x 10<sup>3</sup></b>	<b>75</b>	<b>8</b>	<b>nein</b>	
<b>1 x 10<sup>4</sup></b>	<b>750</b>	<b>75</b>	<b>ja</b>	
<b>2 x 10<sup>4</sup></b>	<b>1500</b>	<b>150</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>

**Tabelle 9:** Getestete Verhältnisse in dem endoptimierten Telomerase-Assay. Als Telomerase-Quelle diente das Jurkat-Zelllysate. In der ersten Spalte ist die Zellzahl, die in der Ausgangslösung Jurkat+Mix (Bind.) enthalten war, angegeben. In der zweiten Spalte steht die Anzahl der Zellen, die in die Reverse-Transkriptase-Reaktion eingesetzt wurden, in der dritten Spalte das entsprechende Aliquot, das in die nachfolgende PCR gegeben wurde. Mit gleicher Farbe sind die zusammengehörenden Werte aus ein und demselben Versuch gekennzeichnet. Die Nachweisgrenze ist fett dargestellt. Eine Hintergrund-Kontrolle (unbeschichtete *Beads* in der Inkubation) wurde nur zu dem Wert mit der höchsten Zellzahl in der Ausgangslösung Jurkat+Mix (Bind.) mitgeführt.

Nachdem die optimalen Versuchsbedingungen gefunden wurden, wurde das Telomerase-Assay nach dem Fleißdiagramm aus **Abb. 39** mit der Telomerase-reichen Jurkat-Zelllinie und der HUVEC-Zelllinie durchgeführt. Die HUVEC-Zelllinie stellte eine aussichtsreiche Kontrolle dar, da sie keine Telomerase-Aktivität besitzt, sondern nur die freie hTR [226].

Der Hot Start TRAP-Assay mit den Lysaten beider Zelllinien ist in **Abb. 41** dargestellt.



**Abb. 41:** Direkter Hot Start TRAP-Assay mit dem Jurkat- und HUVEC-Zelllysats. Je 2  $\mu$ l des HUVEC-Zelllysats und 2  $\mu$ l einer (1:1000)-Verdünnung des Jurkat-Lysats, welche Jurkat-Lysat aus 100 Zellen entsprachen, wurden in den Assay eingesetzt. Die ganzen Ansätze (25  $\mu$ l) wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die unbeschichteten *Beads* wurden als Kontrolle nicht mehr mitgeführt. Nach der Vorinkubation wurden mit den Durchläufen D1 beider Zelllinien, versetzt mit Lachs-Sperma-DNA und Poly(A)-RNA, **nur**  $\beta$ -20n/PS-beschichtete *Beads* inkubiert. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen wurde hier nicht bei beiden Zelllinien nach Zellzahl eingestellt. Es wurde ein Aliquot von der Jurkat-Zelllinie eingesetzt, welches  $2 \times 10^4$  Zellen enthalten sollte. Von der HUVEC-Zelllinie wurde ein Aliquot genommen, welches denselben Proteingehalt besaß, wie das Jurkat-Aliquot.

Entgegen der Erwartungen wurde von der HUVEC-Probe ein sehr schwaches Signal detektiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Telomerase-Quelle für die Entwicklung des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase

Die erste Telomerase-Quelle, welche für die Entwicklung des Telomerase-Assays hergestellt wurde, war ein Zelllysate aus der Zelllinie HL-60. Sie besaß eine sehr hohe Telomerase-Aktivität, wies jedoch auch DNase-Aktivität auf. Diese DNase-Aktivität störte den TRAP-Assay nicht, da stark verdünnte Proben benutzt wurden und die eigentliche Telomerase-Reaktion nur 10 min dauerte. Bei dem direkten Telomerase-Assay wurden jedoch konzentriertere Proben und längere Inkubationszeiten (bis zu 2 h) eingesetzt, und bei diesen Versuchen wurde ein Abbau des Substrat-Primers ( $\beta$ -TS) beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit der Veröffentlichung von Yoshida et al. [221] überein, welche DNase-Aktivität auch in unbehandelten HL-60-Zellen gezeigt haben.

In dieser Arbeit sollte ein neuer Telomerase-Assay entwickelt werden. Dabei sollte der Nachweis der hTR über einen OLA erfolgen. DNase-haltige Lysate waren für diesen Assay nicht als Telomerase-Quelle geeignet. Die Ligationspartner in dem OLA waren DNA-Oligonukleotide, die in einem DNase-haltigen Lysat verdaut würden. Deshalb mussten die DNasen aus der Telomerase-Quelle entfernt werden.

Zu diesem Zweck wurde die Telomerase aus HL-60-Zellen über Anionenaustauschchromatographie (FPLC) aufgereinigt. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass die DNasen nicht an die Säule banden und in dem Durchlauf und Waschfraktionen vorhanden waren, während die Telomerase an den Anionenaustauscher gebunden wurde. In der weiteren Optimierung wurde der lineare Gradient durch einen Stufengradienten, und die FPLC-Anlage durch eine Anionenaustauscher-Zentrifugationseinheit ersetzt, wodurch die Notwendigkeit einer FPLC-Anlage entfiel. Die Dialyse über Nacht wurde durch ein Umpuffern in einem Konzentrator ausgetauscht, wodurch kein Kühlraum mehr benötigt wurde. Diese Änderungen verkürzten die Zeit für die Aufreinigung von zwei auf einen halben Tag und ermöglichten das Durchführen der Arbeiten bei Raumtemperatur mit Hilfe einer Kühlzentrifuge.

Durch Änderungen des pH-Werts wurde die Telomerase in der Fraktion, die 1000 mM KCl enthielt, eluiert. Auf diese Weise wurde sie von der Hauptmasse der Proteine abgetrennt.

Durch das nachfolgende Umpuffern im Konzentrator mit einem MWCO von 100 kDa, wurde eine zusätzliche Abtrennung von niedermolekulareren Proteinen erreicht.

Im letzten Optimierungsschritt wurden die HL-60-Zellen gegen HeLa-Zellkernextrakt als Telomerase-Quelle für die Aufreinigung ersetzt, wodurch die tagelange und teure Anzucht der Zellen, sowie der zeitintensive Aufschluss, der im Kühlraum durchgeführt werden musste, entfielen. Diese Änderung sollte auch die Ausbeute und Reinheit erhöhen, da das HeLa-Zellkernextrakt eine sehr hohe Telomerase-Aktivität besaß und aus HeLa-Zellkernen hergestellt wurde, welche von den zytosolischen Proteinen abgetrennt wurden.

Während das Lysat aus den HL-60-Zellen nach dem 100.000xg-Schritt (s. 3.1.2) eine sehr hohe Aktivität zeigte, wurde in der optimierten Aufreinigung mit dem HeLa-Zellkernextrakt nach der Ultrazentrifugation entgegen den Erwartungen eine starke Abnahme der Telomerase-Aktivität beobachtet. Wahrscheinlich aggregiert die Telomerase zum Teil mit höhermolekularen Strukturen, welche bei 100.000xg sedimentieren, ohne dabei ihre Aktivität zu verlieren. Dies wäre eventuell mit einem Ultraschall-Schritt vor der Ultrazentrifugation vermeidbar gewesen.

Die nach dem 100.000xg-Schritt im Überstand verbleibende Telomerase wurde erfolgreich aufgereinigt und ankonzentriert. Diese DNase-freie, ankonzentrierte Telomerase-Fraktion war für die Optimierung des OLAs als Telomerase-Quelle geeignet.

Für die Optimierung des Assays, bei dem die Immobilisierung der Telomerase an die Festphase über Phosphorothioat-modifizierte (PS) Oligonukleotide erfolgte, wurde als Telomerase-Quelle das HeLa-Zellkernextrakt oder Jurkat-Zelllysate eingesetzt. Das Jurkat-Lysat wurde nach einem vereinfachten Protokoll hergestellt. Auf diese Weise wurde die Zeit für die Aufarbeitung verkürzt und die Notwendigkeit einer Ultrazentrifuge umgangen. Die Anwesenheit von DNasen in der Telomerase-Quelle spielte bei diesem Assay keine Rolle, da in dem ersten Schritt des Assays die Telomerase-haltige Probe mit einer PS-beschichteten Festphase inkubiert wurde und PS-Oligonukleotide von Nukleasen nicht abgebaut werden können.

## 4.2 Immobilisierung der Telomerase an die Festphase

Der erste Schritt des Assays zum Nachweis der humanen Telomerase war die Immobilisierung des Telomerase-Moleküls an eine Festphase. Diese Bindung sollte über die Protein-Untereinheit (hTERT) erfolgen. Hierfür waren zwei Festphasen geeignet : Heparin-Sepharose und Phosphorothioat-beschichtete *Beads*.

### 4.2.1 Immobilisierung der Telomerase an Heparin-Sepharose

Es wurde versucht, die Telomerase an Heparin-Sepharose zu binden. Heparin-Sepharose ist käuflich zu erwerben, und die Bindungsbedingungen waren von Pai et al. [224] beschrieben. Da das Ziel nicht die Aufreinigung der humanen Telomerase, sondern die Immobilisierung an die Festphase zwecks Entwicklung eines Assays war, wurde die Telomerase nicht an eine Heparin-Sepharose-Säule wie in der Publikation, sondern im *Batch*-Verfahren gebunden.

Bei den Immobilisierungsversuchen wurde das ursprüngliche *Batch*-Verfahren durch ein „Zentrifugations“-Verfahren ersetzt. Irreführend waren die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse (s. **Abb. 28**). Das Protein, welches der TERT (H-231)-Antikörper von Santa Cruz als Telomerase erkennt, bindet vollständig an die Heparin-Sepharose im „Zentrifugations“-Verfahren und wird mit 250 mM KCl vollständig eluiert. Laut Western-Blot konnte man die Telomerase erfolgreich an die Heparin-Sepharose binden. Der TRAP-Assay zeigte jedoch ein sehr starkes Signal im Durchlauf und fast keine Telomerase-Aktivität in der 250 mM KCl-Fraktion. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass Heparin abgebrochen und in die Fraktionen gekommen war, wo es die Telomerase gehemmt hätte. Dies würde das Signal aus dem Eluat erklären. Die gehemmte Telomerase würde im TRAP-Assay ein sehr schwaches Signal geben, während der Antikörper die inhibierte Telomerase erkennen würde und im Western-Blot ein starkes Signal zu beobachten wäre. Dagegen spricht das sehr starke TRAP-Assay-Signal im Durchlauf. Der Antikörper wurde in zusätzlichen Versuchen kontrolliert. In einem Western-Blot mit Fraktionen der optimierten Telomerase-Aufreinigung erkannte der Antikörper ein Signal in der Ausgangslösung (Lysat) und in der 250 mM-Fraktion, in der keine Telomerase-Aktivität im TRAP-Assay detektiert wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass der TERT (H-231) von Santa Cruz ein anderes Protein, jedoch keine Telomerase, erkennt.



Deshalb wurden die Ergebnisse anhand des TRAP-Assays bewertet. Die Bindung der Telomerase an die Heparin-Sepharose war im „Zentrifugations“-Verfahren nicht effektiv. Wahrscheinlich reicht die kurze Zentrifugationszeit nicht aus, um die Telomerase an die Heparin-Sepharose zu binden.

#### **4.2.2 Immobilisierung der Telomerase an *Beads*, beschichtet mit Phosphorothioat-modifizierten (PS) Oligonukleotiden**

Um die Telomerase über ein PS-Oligonukleotid an die Festphase zu immobilisieren, musste zuerst die PS-beschichtete Festphase hergestellt werden, da sie käuflich nicht zu erwerben ist. Zu diesem Zweck sollte ein biotinyliertes PS-Oligonukleotid an die Festphase gebunden werden. Als Festphase wurden UltraLink® Immobilized NeutrAvidin™ Protein Plus *Beads* gewählt. Diese *Beads* besitzen eine große Bindungskapazität, sind robust, und gehen geringe unspezifische Bindungen ein. Eine mögliche alternative Festphase wären Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten gewesen. Diese wiesen jedoch im Vergleich zu den *Beads* eine viel kleinere Bindungskapazität auf, und waren für die Optimierung des Assays nicht geeignet.

Als PS-Oligonukleotid wurde ein 20mer ( $\beta$ -20n/PS) gewählt, welches als sehr guter Inhibitor der humanen Telomerase beschrieben wurde [205].

Im TRAP-Assay wurde die benötigte Menge  $\beta$ -20n/PS bestimmt, die zur vollständigen Hemmung der Telomerase in einem definierten Volumen HeLa-Zellkernextrakt eingesetzt werden musste (3.3.2.1). Diese  $\beta$ -20n/PS-Menge musste an die NeutrAvidin™ Protein Plus *Beads* gebunden werden. Entgegen den Erwartungen wurde festgestellt, dass ein großer Überschuss an Biotin-Bindungsstellen (*Beads*) gegenüber dem  $\beta$ -20n/PS benötigt wird, um das Oligonukleotid vollständig zu binden (Verhältnis *Beads* :  $\beta$ -20n/PS von (10:1), s. 3.3.2.2). Ähnliche Beobachtungen wurden von Karboord und Liermann [227] mit NeutrAvidin™ Protein Agarose *Beads* gemacht. In ihren Versuchen wurde eine 25 Bp lange, biotinylierte, doppelsträngige DNA an die *Beads* gebunden. Die theoretische Bindungskapazität wird als mol freies Biotin, welche pro  $\mu$ l *resin* gebunden werden können, angegeben. Während das freie Biotin leicht zu vielen Bindungsstellen diffundieren kann, sind größere Moleküle wie Proteine und DNA sterisch behindert. Die praktische Bindungskapazität stellte für die NeutrAvidin™ Protein Agarose *Beads* 25-30 % der theoretischen maximalen

Bindungskapazität dar und zeigte, dass viele Bindungsstellen für die größeren Moleküle nicht zugänglich sind.

Wahrscheinlich besteht bei den UltraLink® Immobilized NeutrAvidin™ Protein Plus *Beads* dasselbe Problem, so dass für die Bindung einer bestimmten Menge von biotinyliertem Oligonukleotid wesentlich mehr *Beads* eingesetzt werden müssen als theoretisch berechnet, und dieses Verhältnis muss empirisch bestimmt werden.

Die  $\beta$ -20n/PS-beschichteten *Beads* wurden mit der Telomerase-haltigen Probe inkubiert, um die Telomerase an die Festphase zu immobilisieren (s. **Abb. 31** in 3.3.2.3 und **Abb. 33** in 3.4.1).

Die sehr starke Abnahme der Telomerase-Aktivität nach der Inkubation mit den beschichteten *Beads* lässt darauf schließen, dass die Telomerase spezifisch an die 20n/PS-Oligonukleotide bindet. Wenn das nicht der Fall wäre, sondern das Enzym nur eine starke, unspezifische Bindung mit dem *resin* eingehen würde, dann würde auch der Durchlauf der Kontrolle (unbeschichtete *Beads*) nach der Inkubation mit der Telomerase-haltigen Probe, keine Telomerase-Aktivität enthalten. Ebenso würden sich Reste der Telomerase nicht von den unbeschichteten *Beads* auswaschen lassen.

Obwohl die Menge  $\beta$ -20n/PS, die an die *Beads* gebunden war, ausreichen müsste, um die Telomerase vollständig zu hemmen, wurde aus dem Durchlauf ein schwaches Signal beobachtet. Da PS-modifizierte Oligonukleotide Nuklease-resistent sind, kann dies nicht durch Abbau der gebundenen 20n/PS-Oligonukleotide, welcher die „Inhibitor-Menge“ an den *Beads* heruntersetzen würde, begründet sein.

Wahrscheinlich ist die Ursache dafür, dass die Telomerase mit PS-Oligonukleotiden, die an den *Beads* gebunden waren, „herausgefischt“ wurde. Bei diesem Verfahren ist die Bindungsfreiheit nicht so groß, wie wenn die Telomerase zuerst gehemmt, und dann der PS-Oligonukleotid-Telomerase-Komplex an die *Beads* gebunden worden wäre. Es könnte auch sein, dass die ganze Länge der gebundenen 20n/PS-Oligonukleotide nicht ausgenutzt werden kann. Dadurch könnten die gebundenen  $\beta$ -20n/PS-Oligonukleotide wie kürzere PS-Oligonukleotide wirken, welche das Enzym nicht so gut inhibieren [205].

Die quantitative Bindung der Telomerase wurde durch Erhöhung der Menge der beschichteten *Beads* erreicht. Eine mögliche Alternative dazu wäre das PS-Oligonukleotid zu verlängern,

oder 5'-terminal einen Spacer einzufügen, welcher eine bessere Zugänglichkeit zu dem PS-Oligonukleotid gewährleisten würde.

Die einmal an die beschichteten *Beads* gebundene Telomerase konnte mit steigender Salzkonzentration nicht wieder eluiert werden (s. **Abb. 33** in **3.4.1**). Dieses Ergebnis wurde ausgenutzt, um die Waschschrte mit 300-1000 mM KCl-haltigem Puffer durch einen Waschschrte mit 2000 mM KCl-haltigem Puffer zu ersetzen. Auf diese Weise wurde die Zeit für den ersten Schrit des Telomerase-Assays (Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads*) stark gekürzt. Außerdem können Proteine, die unspezifisch an die *Beads* gebunden werden, durch diesen Waschschrte mit hohem KCl-Gehalt, entfernt werden.

Im Vergleich zur Heparin-Sepharose erwiesen sich die 20n/PS-beschichteten *Beads* als die viel bessere Festphase für die Immobilisierung der humanen Telomerase. Während unter den getesteten Bedingungen keine effektive Bindung der humanen Telomerase an die Heparin-Sepharose gelang, konnte die Telomerase erfolgreich an die 20n/PS-beschichteten *Beads* immobilisiert werden. Nachteilig ist jedoch, dass diese Festphase nicht verkauft wird. Dadurch muss immer der Beschichtungsschrte durchgeführt werden, welcher die Gesamtzeit für den Telomerase-Assay verlängert. Im Gegensatz dazu, ist Heparin-Sepharose mit konstanter Qualität käuflich zu erwerben.

### 4.3 Nachweis der hTR

Bei dem zweiten Schrit des Telomerase-Assays (spezifischer Nachweis der Telomerase durch Detektion der hTR aus dem Telomerase-Molekül) wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet : ein Oligonukleotid-Ligations-Assay und ein Nachweis mittels Reverser-Transkriptase-PCR.

#### 4.3.1 Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA)

##### 4.3.1.1 OLA mit der 3'-blocked tDNA

Mit der 3'-blocked tDNA als Template (Positivkontrolle) wurden die optimalen Bedingungen für den OLA gefunden.

Es wurde festgestellt, dass bei einem Überschuss an 3'-blocked tDNA gegenüber den Ligationsprimern mehr Ligationprodukt gebildet wird (s. **Tabelle 5** und **6** in **3.2.2**). Ähnliche Beobachtungen wurden von Faulhammer et al. [228] gemacht. Sie haben drei Templates, welche 12, 16 und 20 Basen lang waren, und zwei Ligationsprimer, die entsprechend mit je 6, 8 bzw. 10 Basen mit dem Template hybridisieren konnten, in einen OLA eingesetzt. Bei den Oligonukleotiden handelte es sich um DNA-Oligonukleotide. Der OLA wurde bei unterschiedlichen Temperaturen und Verhältnissen des Templates zu den Ligationsprimern durchgeführt. Der Donor war teilweise am 5'-Ende radioaktiv markiert. Nach der Ligation wurden die Reaktionsprodukte von den nicht-ligierten Oligonukleotiden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt, und nach Trocknen wurde das Gel mit einem Phosphorimager analysiert und ausgewertet. Die Ligationseffizienz wurde als Prozent Ligationprodukt von der Gesamt-Radioaktivität in jeder Spur des Gels dargestellt. Bei 4 °C wurden folgende Ligationseffizienzen bestimmt :

Template aus x Basen, Ligationsprimer überlappen mit y Basen mit dem Template	Ligationseffizienz		
	T : L = (1 : 5)	T : L = (1 : 1)	T : L = (2 : 1)
x = 12, y = 6	ca. 1,3 %	ca. 9 %	ca. 15 %
x = 16, y = 8	ca. 2 %	ca. 22 %	ca. 25 %
x = 20, y = 10	ca. 6,5 %	ca. 19 %	ca. 17,5 %

**Tabelle 10:** Vergleich der Ligationseffizienz bei 4 °C in Abhängigkeit von dem Verhältnis Template : Ligationsprimer (modifiziert nach [228]). Die Werte wurden von den Diagrammen in der Publikation abgelesen. Abkürzungen: **T:L** : Molares Verhältnis des Templates (T) zu den Ligationsprimern (L).

Die höchsten Ligationseffizienzen bei 4 °C wurden mit den Ligationsprimern, die mit 6 bzw. 8 Basen mit dem Template hybridisieren, bei einem Überschuss an Template gegenüber den Ligationsprimern erreicht. Bei den Ligationsprimern, die mit 10 Basen mit dem Template überlappen, ist die Ligationseffizienz bei einem T:L von (1:1) etwas höher, als bei einem Überschuss an Template gegenüber den Ligationsprimern.

Der OLA wurde mit einem „gecyclten“ OLA (OLA+**ΔT**) verglichen (s. **Abb. 17** in **3.2.2**). Das günstigere Verhältnis für den OLA sowie OLA+**ΔT** war 3'-blocked tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras (6:1:2). Die Ursache dafür könnte sein, dass der Donor-U4-ras unspezifische

Ligationsreaktionen eingeht. In **Abb. 17** wurde in Spuren **6.-9.** und **13.-16.** eine Bande oberhalb des Donor-U4-ras beobachtet, sowie sehr schwache Banden, die zw. dem ras-TSL und dem Ligationprodukt laufen. Diese Bande entstehen in der Ligation, da sie in den Kontrollen (Spur **4.-5.** und **17.-18.**), die keine T4 DNA Ligase enthalten, und in der Donor-U4-ras-Spur (Spur **10.**) nicht detektiert werden können. Bei der Bande, die oberhalb des Donor-U4-ras läuft, könnte es sich um den adenylierten Donor handeln [229]. Es könnte auch sein, dass die Oligonukleotide Verunreinigungen enthalten, die zu kurz sind, um in der Färbung nachgewiesen zu werden, die jedoch an der Ligation teilnehmen können (z.B. ein Oligonukleotid, das ein kurzes Stück von der 3-terminalen ras-TSL-Sequenz besitzt). Wahrscheinlich bleibt deshalb bei dem Verhältnis (6:1:1) ras-TSL übrig : der Donor-U4-ras geht nur teilweise die Ligation mit dem ras-TSL ein, während der Rest des Donors unspezifische Produkte bildet bzw. in adenylierter Form bleibt. Bei dem Verhältnis (6:1:2) jedoch, wäre genug Donor-U4-ras für beides vorhanden, um mit dem gesamten ras-TSL zu reagieren, und die unspezifischen Produkte zu bilden.

Bei den getesteten Verhältnissen wurde im OLA+**ΔT** etwas mehr Ligationprodukt gebildet als im OLA. Ein möglicher Grund dafür könnte der 38 °C-Schritt sein, der zum Schmelzen der Doppelhelix diene. Es ist auch möglich, dass die Ligationszeit (30 Schritte je 10 min), die 300 min entspricht, und somit 120 min länger als beim OLA ist, der Grund für die größere Ligationproduktbildung beim OLA+**ΔT** ist.

Bei dem Verhältnis 3'-*blocked* tDNA : ras-TSL : Donor-U4-ras von (6:1:2) waren die Unterschiede zw. OLA und OLA+**ΔT** kleiner als bei dem Verhältnis (6:1:1), und konnten vernachlässigt werden. Dieses Ergebnis berechtigte dazu, die Ligation in den weiteren Versuchen mit der Positivkontrolle und der Telomerase als OLA durchzuführen. Dadurch konnte der Versuchsablauf um mehr als 3 h gekürzt werden, und die Notwendigkeit eines Thermocyclers entfiel.

#### 4.3.1.2 OLA mit der Telomerase

Im OLA mit dem Telomerase-Molekül wurde direkt kein Ligationprodukt detektiert. Damit Ligationprodukt gebildet wird, müssen der ras-TSL und der Donor-U4-ras ihren Wirkungsort erreichen. Während der ras-TSL die *anchor site* der hTERT **und** das Template der hTR bindet, muss der Donor-U4-ras nur die hTR effektiv binden um an dem OLA teilnehmen zu können.

Für den ras-TSL konnte gezeigt werden, dass er seinen Bestimmungsort findet (s. **3.2.1**), für den Donor-U4-ras bestand keine Testmöglichkeit. Es ist möglich, dass sterische Hindernisse dazu führten, dass der Donor-U4-ras die hTR nicht binden konnte, und deshalb kein Ligationsprodukt gebildet wurde.

Es könnte jedoch sein, dass nicht die Zugänglichkeit der hTR das Problem war. Matthes et al. haben die humane Telomerase mit einem 20 Basen langem PS-Oligonukleotid, welches nicht-komplementär zur hTR ist, und einem unmodifizierten Oligonukleotid, das komplementär zu den 11 Template-Basen und 2 benachbarten *downstream* Basen der hTR ist, gehemmt. Die Oligonukleotide wurden allein oder in Kombination verabreicht. Dieselben Versuche wurde auch mit einem abasischen Oligomer (20mer), das nur 19 Phosphorothioat-modifizierte Bindungen enthielt, und einem PNA, komplementär zu 9 Template-Basen und 4 benachbarten *upstream* Basen der hTR (T9/U4/PNA), durchgeführt. In beiden Fällen wurde beobachtet, dass wenn beide Oligonukleotide zur Telomerase gegeben wurden, sich ihre Hemm-Aktivität nahezu additiv vergrößerte. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass beide Oligonukleotid-Arten unterschiedliche Targets haben : die PS-Oligonukleotide bzw. das abasische Oligomer binden die *anchor site* der hTERT, während die komplementären Oligonukleotide die hTR binden, und auf diese Weise zusammen eine verstärkte Hemmung der Telomerase bewirken [197]. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die gleichzeitig verabreichten Oligonukleotide, welche die *anchor site* und die hTR binden, sich räumlich nicht behindern und ihre Targets erreichen können.

Schnapp et al. [225] haben erfolgreich ein 26 Basen langes Oligonukleotid zur Bindung der humanen Telomerase eingesetzt. Dieses Oligonukleotid war komplementär zu den 11 Basen des Templates der hTR und den 3 benachbarten *downstream* Basen, und war 5'-terminal zur hTR-spezifischen Sequenz um 12 Basen, die eine Zufallssequenz besaßen, verlängert. Die 11 Basen komplementär zum Template waren 2'-O-Methyl-modifiziert. Von der Länge ist dieses Oligonukleotid, das die hTR effektiv bindet, vergleichbar mit dem Donor-U4-ras, der 30 Basen lang ist.

Es könnte sein, dass die Struktur des Donor-U4-ras-Moleküls nicht optimal war. Der Donor-U4-ras ist ein DNA-Oligonukleotid mit unmodifizierten Phosphodiester-Bindungen. Solche unmodifizierten Oligonukleotide binden/hemmen in manchen Fällen die Telomerase viel schlechter als Oligonukleotide mit modifiziertem Rückgrat. Z.B. hat ein unmodifiziertes

Oligonukleotid, das komplementär zu den 11 Template Basen und den 4 Basen *upstream* des Templates ist, einen  $IC_{50}$ -Wert von 460 nM für die Inhibierung der Telomerase aus HL-60-Zellen. Das T9/U4/PNA jedoch, das ein PNA-Rückgrat besitzt, hat einen  $IC_{50}$ -Wert von 6,5 nM [205]. Eine Modifikation des Rückgrats des Moleküls hätte vielleicht eine bessere Bindung des Donor-U4-ras an die hTR bewirkt, war jedoch nicht möglich, da dieses Molekül nicht von der T4 DNA Ligase im Ligationsschritt angenommen würde.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass nicht die Ligationsprimer ihren Wirkungsort nicht erreichen können, sondern die T4 DNA Ligase. Das Template der hTR ist nicht unzugänglich für Proteine. RNase A z.B. ist in der Lage bis zur hTR zu gelangen und die RNA zu verdauen. Das lässt sich aus dem Ergebnis schließen, dass eine Telomerase-positive Probe, die mit RNase A vorbehandelt wurde, keine Telomerase-Aktivität zeigte [230]. RNase A ist jedoch im Vergleich zu der T4 DNA Ligase ein kleines Molekül. Während RNase A ein Molekulargewicht von 13,7 kDa besitzt [231], weist die T4 DNA Ligase ein Molekulargewicht von 55,3 kDa auf [232], und ist somit ca. 4 Mal größer als RNase A. Vielleicht sind sterische Hindernisse, welche dazu führen, dass die T4 DNA Ligase nicht bis zum Template der hTR durchdringen kann, die Ursache dafür, dass kein direktes Ligationsprodukt gebildet wurde.

Falls jedoch die Ligationsprimer und die T4 DNA Ligase ihren Bestimmungsort erreichen können, könnte das ungünstige Ligationsverhältnis, bedingt durch die Art der Ligationspartner und des Templates für die Ligation (s. **4.3.1.3**), der Grund für die fehlenden Ligationsprodukte sein.

Ein Nachweis der Ligationsprodukte mittels ras-PCR war durch eine starke PCR-Nebenproduktbildung weder in den OLA-Ansätzen mit der Positivkontrolle (s. **3.2.5**), noch in den OLA-Ansätzen mit der Telomerase möglich. Problematisch war die Bildung einer 70 Bp langen Bande in den 0-Werten (s. **Abb. 21** und **22** in **3.2.5**). In 0-Wert 1, der die 3'-*blocked* tDNA und die beiden Ligationsprimer enthält (s. Spur **3**. in **Abb. 21** und **Abb. 22**), kann kein Ligationsprodukt gebildet werden, da diese Ansätze keine T4 DNA Ligase enthalten. Hier ist der Grund für die Nebenproduktbildung der Donor-U4-ras, da dieser Ligationsprimer mit den PCR-Primern in der ras-PCR zur Entstehung unspezifischer Produkte führt. Ein zusätzlicher Hinweis darauf ist auch, dass durch Herabsetzen der Donor-U4-ras-

Konzentration und einer Hot Start PCR, die Produktbildung in diesem Ansatz unterdrückt werden konnte. In 0-Wert 2, der kein Template für die Ligation, jedoch T4 DNA Ligase enthält, kann außer dem Donor-U4-ras, auch Template-unabhängige Ligation die Ursache für die 70 Bp-lange Bande sein. Kuhn und Frank-Kamenetskii [233] haben zum ersten Mal gezeigt, dass die T4 DNA Ligase in der Lage ist, zwei DNA-Einzelstränge in Abwesenheit einer doppelsträngigen Struktur an der Ligationsstelle, d.h. Template-unabhängig, zu ligieren, wenn auch mit geringer Effizienz. Die geringe Effizienz dieser Ligation würde erklären, warum das Produkt im direkten Nachweis nicht sichtbar war, sondern erst nach Amplifikation mittels PCR detektiert wurde.

Es könnte jedoch auch sein, dass ein kurzes Segment in einem der Ligationsprimer als Template dient, und dadurch zu einer unspezifischen, Template-gerichteten Ligation führt [233].

Für einen solchen Vorgang spricht auch der Vergleich von Spur 4. und 5. in **Abb. 18** (s. 3.2.2). In Spur 5., die keine 3'-blocked tDNA enthält, wird eine intensive Bande, welche zwischen dem ras-TSL und dem Ligationsprodukt läuft, beobachtet. Diese Bande wird durch Ligation gebildet, da sie in Spur 4., die keine T4 DNA Ligase enthält, nicht detektiert werden kann. Es könnte sein, dass auf diese Weise auch das Ligationsprodukt gebildet wird, jedoch in viel geringeren Mengen, da es nicht direkt nachgewiesen werden kann.

#### 4.3.1.3 Modifizierter OLA mit der hTR

Um das Problem mit der starken Nebenproduktbildung, für die der Donor-U4-ras verantwortlich war, zu lösen, wurde der OLA modifiziert (s. 3.2.6). In dem modifizierten OLA wurde als Template die hTR eingesetzt, und die nachfolgende ras-PCR in einer „Donor-freien“ Umgebung durchgeführt (s. **Abb. 24**). Mit den eingeführten Änderungen sollten eventuelle Probleme mit der Zugänglichkeit des Wirkungsorts der Ligationsprimer bzw. T4 DNA Ligase, die bei dem OLA mit dem Telomerase-Molekül eine Rolle spielen könnten, gelöst werden, da nicht mehr das ganze Molekül eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden Ligationsprimer, die besser mit der hTR hybridisierten, da sie länger waren, und teilweise eine Sequenz besaßen, welche den OLA begünstigen sollte [211,212], benutzt.

Mit einer ähnlichen OLA-Strategie wurde das Hepatitis C Virus (HCV) erfolgreich nachgewiesen. Als Ausgangsmaterial diente Blutserum [234] oder Formalin-fixiertes,



Paraffin-eingebettetes Lebergewebe [235,236]. Die HCV-RNA wurde nach Lyse der Viren mit zwei biotinylierten „Fang“-Sonden und zwei Ligations-Sonden versetzt. Nach Hybridisierung der Sonden mit der RNA, wurde das Hybrid an Streptavidin-beschichtete *Magnetbeads* gebunden, und gewaschen. Es folgte die Ligation der beiden Ligations-Sonden und eine zweifache, nachträgliche Amplifikation des Ligationsprodukts. In der ersten PCR wurde das ganze Ligationsprodukt amplifiziert. Das Produkt dieser PCR wurde dann in eine „semi-nested“ PCR eingesetzt, wodurch die Sensitivität des Assays erhöht wurde. Die Nachweisgrenze lag bei 100 HCV-RNA-Molekülen pro Probe [234].

Als Positivkontrolle bei dem modifizierten OLA wurde die 3'-*blocked* tDNA mitgeführt. Dieser Ansatz (s. Spur 10. in **Abb. 26-1.** und Spur 6. in **Abb. 26-2.** in 3.2.6.2) zeigte, dass, wenn das Ligationsprodukt gebildet wird, es erfolgreich an die Wände eines Streptavidin-beschichteten PCR-*Tubes* immobilisiert, und mit Hilfe einer ras-PCR nachgewiesen werden kann. Die starke PCR-Nebenproduktbildung in den 0-Werten, die keine 3'-*blocked* tDNA, jedoch T4 DNA Ligase enthielten (s. Spur 4. in **Abb. 22** in 3.2.5.2), wurde nicht mehr beobachtet (s. Spur 1. in **Abb. 26**). Dies lässt darauf schließen, dass durch die Bindung des Ligationsprodukts an die Wände des PCR-*Tubes* und die nachträglichen Waschschritte, die Reste von Donor-U4-ras entfernt werden konnten, und die ras-PCR nicht mehr störten.

In dem 0-Wert, der keine T4 DNA Ligase enthielt, jedoch die 3'-*blocked* tDNA, wurde nicht-reproduzierbar eine Bande auf Produkthöhe beobachtet (s. Spur 9. in **Abb. 26-1.**), die verschwand, wenn weniger von dem OLA-Ansatz in die ras-PCR eingesetzt wurde. Wahrscheinlich ist die Ursache dafür folgende : das Hybrid, welches aus 3'-*blocked* tDNA,  $\beta$ -ras-TR und Donor-U4-ras besteht, wurde auch an die Wände des PCR-*Tubes* gebunden und durch die Waschvorgänge nicht zerstört. Dadurch wurde in die ras-PCR Donor-U4-ras eingebracht, welcher zu Nebenproduktbildung führte.

In den Ansätzen mit der hTR wurde eine äußerst schwache Bande mit dem Ligationsprimerpaar  $\beta$ -ras-TR/Donor-U4-ras (s. Spur 2.-3. in **Abb. 26-1.**) auf Höhe des Ligationsprodukts beobachtet. Diese Banden konnte nicht durch Reste von Donor-U4-ras, die von dem Hybrid hTR/ $\beta$ -ras-TR/Donor-U4-ras zurückgehalten wurden, verursacht sein, da das Template (hTR) nach dem OLA mit RNase verdaut wurde. Erst dann wurden die Ansätze an die Wände der PCR-*Tubes* gebunden, und im nächsten Schritt die *Tubes* extensiv gewaschen.

Mit dem Ligationsprimerpaar  $\beta$ -ras-Akzeptor(N)/(N)Donor-ras wurden ebenfalls winzige Signale detektiert, bei denen es sich um Ligationsprodukt oder einem PCR-Nebenprodukt handeln kann, da diese Bande auch nicht-reproduzierbar in dem 0-Wert, der nur die Ligationsprimer enthielt, detektiert wurde. Falls es ein Nebenprodukt der PCR war, dann könnte es durch eine Interaktion des  $\beta$ -ras-Akzeptor(N) mit den ras-Primern entstanden sein.

Mit dem modifizierten OLA konnten nicht-reproduzierbar, sehr schwache Ligationsprodukt-Banden nachgewiesen werden. Da mit der Positivkontrolle gezeigt werden konnte, dass wenn Ligationsprodukt gebildet wird, dieses mit diesem Assay nachgewiesen werden kann, muss in den Proben mit der hTR als Template die Ligationsreaktion nicht funktioniert haben.

Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Publikation von Bullard und Bowater [237]. Bullard und Bowater haben die Ligationsrate der T4 DNA Ligase bei unterschiedlichen Temperaturen und doppelsträngigen Substraten untersucht. Die Ligationsreaktionen wurden in Gegenwart von 10 mM  $MgCl_2$  und 1 mM ATP durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** dargestellt.

	Substrat ■ DNA □ RNA	Ligationsrate (mol verknüpfte Nicks / mol Protein / min)		
		bei 37 °C	bei 25 °C	bei 4 °C
1.	5' ■■■■■■ 3' 3' ■■■■■■ 5'	42 (+/- 14)	31 (+/- 7.0)	2.1 (+/- 0.37)
2.	5' □□□□ 3' 3' □□□□ 5'	< 0.001	< 0.001	< 0.001
3.	5' ■■■■■■ 3' 3' □□□□ 5'	< 0.001	k. A.	k. A.
4.	5' ■■■■■■ □□□□ 3' 3' □□□□ 5'	< 0.001	k. A.	k. A.
5.	5' □□□□ ■■■■■■ 3' 3' □□□□ 5'	0.01	< 0.001	< 0.001
6.	5' □□□□ □□□□ 3' 3' ■■■■■■ 5'	0.01	< 0.001	< 0.001
7.	5' □□□□ ■■■■■■ 3' 3' ■■■■■■ 5'	32 (+/- 12)	16 (+/- 5.4)	1.2 (+/- 0.12)
8.	5' ■■■■■■ □□□□ 3' 3' ■■■■■■ 5'	< 0.001	k. A.	k. A.

**Tabelle 11:** Ligation von Nicks in doppelsträngigen Substraten mit Hilfe der T4 DNA Ligase (modifiziert nach [237]). Der Akzeptor war 8 Basen lang und am 5'-Ende mit Fluorescein markiert, der Donor war 12 Basen lang und am 5'-Ende phosphoryliert. Das Template war ein 20mer. Abkürzungen: **k.A.** : keine Angaben.

Das Substrat in dem OLA mit der hTR ist von derselben Art wie Substrat **3** (Donor und Akzeptor bestehen aus DNA, das Template aus RNA) in **Tabelle 11**. Bei diesem Substrat wurde eine äußerst geringe Ligationsrate gemessen, und dies ist vielleicht der Grund, wieso der OLA mit der hTR nicht geklappt hat. Eine andere Ligationsprimer-Kombination zu nehmen, z.B. wie in Substrat **5**, bei der die Ligationsraten etwas höher wären, war nicht möglich, da ein Ligationsprodukt, welches zur Hälfte aus RNA besteht, in der nachfolgenden PCR nicht amplifizierbar gewesen wäre.

Nilsson et al. [211] haben gezeigt, dass für die Ligation von zwei DNA-Oligonukleotiden, wenn das Template eine RNA ist, 1 mM ATP eine suboptimale Konzentration ist. Um so eine Ligation erfolgreich durchzuführen, muss die ATP-Konzentration klein gehalten werden, ein molarer Überschuss der T4 DNA Ligase gegenüber dem Substrat eingesetzt und der Reaktion genügend Zeit gegeben werden. Für den OLA mit der hTR wurden folgende Bedingungen gewählt : 1 µM ATP, 0,5 U/µl T4 DNA Ligase und 1 h Inkubation bei 37 °C. Obwohl diese

Bedingungen nach Nilsson et al. den OLA begünstigen sollten, konnten nur Spuren von Produkt detektiert werden.

Vielleicht hätte ein Wechsel des  $Mg^{2+}$  im Ligationspuffer gegen  $Mn^{2+}$  die Ligationsproduktbildung erhöht. Hsuih et al. [234] haben den OLA mit der HCV-RNA in einem  $MnCl_2$ -haltigen Puffer erfolgreich durchgeführt, sogar in Gegenwart von 1 mM ATP. Sie haben beobachtet, dass beim Austausch des  $MgCl_2$  gegen  $MnCl_2$ , die Ligationseffizienz erhöht wird. Nilsson et al. [211] haben auch festgestellt, dass der Verknüpfungsschritt in der Ligationsreaktion (Verknüpfung des adenylierten Donors mit dem Akzeptor) bei 10 mM  $MnCl_2$  fast doppelt so schnell ist, wie bei 10 mM  $MgCl_2$ . Während in dem 5'-Adenylierungsschritt die  $Mg^{2+}$ -Ionen und die  $Mn^{2+}$ -Ionen gleich effizient sind, scheinen die  $Mn^{2+}$ -Ionen im Verknüpfungsschritt die wirksameren Kofaktoren zu sein.

#### **4.3.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)**

Mit Hilfe einer RT-PCR konnte die hTR erfolgreich nachgewiesen werden (s. **3.2.6.1**). Der Nachweis war eindeutig und wurde von unspezifischen Nebenprodukten der PCR nicht gestört. Das gelegentlich beobachtete PCR-Nebenprodukt, das unter 60 Bp lief, störte die Analyse nicht, da es von dem eigentlichen PCR-Produkt (111 Bp) deutlich unterschieden werden konnte.

Da weder mit dem OLA mit dem Telomerase-Molekül, noch mit dem modifizierten OLA ein erfolgreicher Nachweis der hTR gelang, wurde die hTR im zweiten Schritt des Telomerase-Assays mit Hilfe einer RT-PCR detektiert. Mit dieser Methode war der Nachweis nicht nur eindeutig, sondern sie war auch viel schneller als der OLA, und mit viel geringerem Aufwand verbunden.

#### **4.4 Neuer Assay zum Nachweis der humanen Telomerase**

Mit den Erfahrungen aus **3.2-3.4.1** wurde ein Assay zum Nachweis der humanen Telomerase entwickelt, der in den folgenden zwei Schritten durchgeführt wurde :

1. Immobilisierung der Telomerase an die Festphase mit Hilfe von Phosphorothioat (PS)-modifizierten Oligonukleotiden. In diesem Schritt werden zusammen mit der Telomerase die anderen Heparin-bindenden Proteinen, die in der Probe vorhanden sind, gebunden.
2. Spezifischer Nachweis der Telomerase durch Detektion der hTR, die aus dem Telomerase-Molekül stammt, mittels RT-PCR

Für den Telomerase-Assay mussten solche Bedingungen gefunden werden, unter denen keine freie hTR bzw. Telomerase nach den Waschschritten an den PS-beschichteten *Beads* unspezifisch gebunden blieb. Bei dem Signal von den beschichteten *Beads* konnte nicht unterschieden werden, ob es nur von der Telomerase, die an den PS-Oligonukleotiden gebunden war, verursacht wurde, oder ob Reste von Telomerase bzw. freie hTR, welche unspezifisch an dem *resin* gebunden waren, mit dazu beitrugen. Deshalb wurden bei den Optimierungsversuchen die unbeschichteten *Beads* als Kontrolle mitgeführt. Es wurden solche Bedingungen gesucht, bei denen von den unbeschichteten *Beads*, die mit derselben Telomerase-haltigen Probe unter denselben Bedingungen wie die beschichteten *Beads* behandelt wurden, kein Signal (kein Hintergrund) detektiert werden konnte. Dann konnte davon ausgegangen werden, dass unter diesen Versuchsbedingungen und Probenmengen an dem *resin* keine Telomerase-Reste oder freie hTR unspezifisch gebunden waren bzw. die Menge unter der Nachweisgrenze lag. Wenn unter denselben Bedingungen ein Signal von den PS-beschichteten *Beads* erhalten wurde, so war dieses Signal durch die Telomerase, die über ihre hTERT-Untereinheit an den PS-Oligonukleotiden immobilisiert war, bedingt.

Das größte Problem bei der Optimierung des Telomerase-Assays stellte das Entfernen des Hintergrunds dar. Um dieses Problem zu lösen wurden folgende Schritte durchgeführt :

- Vorinkubation : Die Vorinkubation mit BSA-geblockten, unbeschichteten *Beads* sollte die freie hTR aus der Telomerase-haltigen Probe entfernen.
- Blocken der *Beads* für die Inkubation mit BSA, Poly(A)-RNA und Lachs Sperma DNA. Durch dieses Blocken sollten Protein- sowie Nukleinsäurebindungen an den *Beads* unterbunden werden.

- Zugabe von Poly(A)-RNA und Lachs Sperma DNA zu dem Durchlauf der Vorinkubation. Auf diese Weise sollten während der Inkubation der Telomerase-haltigen Probe mit den *Beads*, die unspezifischen Nukleinsäurebindungen an die *Beads* unterdrückt werden.
- Extensives Waschen der *Beads* nach der Inkubation

Trotz dieser Maßnahmen wurde von den Kontrollen ein Signal detektiert (s. Spur **3.**, Teil **2.** in **Abb. 36, 3.4.2.1**). Dieser Hintergrund konnte durch Reste von Telomerase oder durch freie hTR verursacht sein.

Da es auf dem Markt keinen funktionierenden anti-Telomerase-Antikörper gibt, den man im Western-Blot einsetzen könnte, war es nicht möglich zu bestimmen, ob Telomerase-Reste, die nach der Inkubation und den Waschschritten an den *Beads* gebunden bleiben, die Ursache für den Hintergrund waren. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Reste von unspezifisch gebundener Telomerase den Hintergrund verursacht haben. Hierfür sprechen die Ergebnisse aus **3.4.1**. Die Telomerase-Aktivität war nach Inkubation einer Telomerase-haltigen Probe mit unbeschichteten, abgeblockten *Beads* hauptsächlich in dem Durchlauf enthalten, Reste von Aktivität waren in der ersten Waschfraktion, nur Spuren in den übrigen Waschfraktionen zu detektieren. Zusätzlich wurde eine unspezifische Bindung des Enzyms an die *Beads* durch die Einführung von stringenteren Bindungsbedingungen reduziert (Bindung unter 1 M KCl). Wyatt et al. [123] haben in ihren Versuchen auch das UltraLink *resin* (UltraLink® Immobilized NeutrAvidin™ Protein *Beads*) eingesetzt und gezeigt, dass hTERT in Abwesenheit von hTR mit der telomeren DNA interagiert. Sie haben [<sup>35</sup>S]-markierte hTERT, die eine N-terminale FLAG-Markierung besaß, in Abwesenheit der hTR in Kaninchen Retikulozytenlysate (*RRL*) *in vitro* synthetisiert. Die *Beads* wurden mit *RRL* hTERT für 30 min bei 4 °C geblockt. Zu der Protein-Untereinheit der Telomerase (hTERT) wurden verschiedene biotinylierte Oligonukleotide (Primer) zugegeben, und nach einer Inkubationszeit wurden die hTERT-Primer-Komplexe an die geblockten *Beads* gebunden. Nach der Immobilisierung der Komplexe wurden die *Beads* gewaschen, und anschließend mit SDS-Probenpuffer aufgeköcht, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und die Reaktionsprodukte mittels Autoradiographie detektiert. Unter den experimentellen Bedingungen wurden nur minimale Mengen an hTERT unspezifisch an die *Beads* gebunden. Dabei wurden ein Puffer, der 100 mM Salz (90,7 mM HEPES [pH 8.0], 7 mM KCl, 2,3 mM MgCl<sub>2</sub>) enthielt und sich in

Vorversuchen als optimal erwiesen hatte, eingesetzt. In diesem Puffer wurden die geblockten *Beads* resuspendiert, und zu ihnen dann der hTERT-Primer-Komplex zugegeben. Dieser Puffer wurde auch zum Waschen der *Beads* benutzt. Wenn unter diesen Bedingungen sehr wenig bindet, ist es wahrscheinlich, dass unter den Bedingungen des entwickelten Telomerase-Assays (Bindung unter 1 M KCl und 0,5 % TritonX-100, Waschen mit bis zu 2 M KCl und 0,5 % TritonX-100), kein Protein unspezifisch an die *Beads* bindet.

Vermutlich wird der Hintergrund von der freien hTR, welche in der Telomerase-haltigen Probe enthalten ist, verursacht. In dem Vorinkubationsschritt sollten die Nukleinsäuren, welche unspezifisch an die *Beads* binden, „rausgefiltert“ werden. Ein ähnliches Verfahren wurde von Eulberg et al. [238] angewandt. Ihnen gelang es, einen automatisierten SELEX-Prozess (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) zu entwickeln. Mit diesem Prozess haben sie RNA-Aptamere des D-Peptids von Substanz P isoliert. In den Versuchen wurde NeutrAvidin Agarose oder NeutrAvidin UltraLink als Selektionsmatrix eingesetzt, mit der die Substanz P•RNA-Komplexe isoliert wurden. Zuerst wurde jedoch der RNA-Pool einer Pre-Selektion unterzogen. Bei der Pre-Selektion wurde die RNA mit der Selektionsmatrix inkubiert, um potentielle Matrix-bindende RNA-Spezies aus der RNA-Bank zu entfernen. Der Überstand der Pre-Selektion wurde dann mit der biotinylierten Substanz P vermischt, und nach Inkubation die Substanz P•RNA-Komplexe an die Selektionsmatrix immobilisiert und weiterverarbeitet.

Wahrscheinlich ist die hTR auch so eine Matrix-bindende RNA-Spezies, welche unspezifische Bindungen eingeht. Eventuell könnten solche Bindungen durch harschere Waschbedingungen unterbunden werden. Hsuih et al. [234] haben erfolgreich unspezifische Bindungen an Streptavidin-beschichteten *Magnetbeads* mit 2 M Guaninthyocyanat unterdrückt. Wilson [239] hat die hohe unspezifische Bindung von RNA an Streptavidin-Agarose durch Abblocken der *Beads* mit tRNA und Waschen unter denaturierenden Bedingungen (4 M-Urea-haltige Puffer und Puffer mit geringem Salzgehalt) stark reduziert. Solche Bedingungen (Guaninthyocyanat oder Urea) würden jedoch die Telomerase, welche auch an den *Beads* gebunden ist, denaturieren, und waren in dem Telomerase-Assay nicht anwendbar.

Das Hintergrund-Problem wurde beim Telomerase-Assay mit der Jurkat-Zelllinie durch Heruntersetzen der Ausgangs-Menge gelöst. Dadurch wurde ein Bereich bestimmt

( $\leq 2 \times 10^4$  Zellen / Probe), in dem die Kapazität der Vorfiltrations-*Beads* nicht überschritten, d.h. die ganze freie hTR gebunden wird, und im Durchlauf nur die Telomerase enthalten ist.

Ein weiterer Hinweis auf die hTR als Ursache für den Hintergrund, ist das Ergebnis des Telomerase-Assays mit der HUVEC-Zelllinie (s. **3.4.2.3**). Diese Zelllinie besitzt keine Telomerase-Aktivität, sondern nur die freie hTR [226]. In diesem Versuch wurde nicht dieselbe Zellzahl von beiden Zelllinien, sondern dieselbe Proteinmenge eingesetzt, wobei diese in der Jurkat-Probe  $2 \times 10^4$  Zellen entsprechen sollte. Das Signal aus der HUVEC-Probe ist mit einem Überladen der Vorfiltrations-*Beads* zu erklären. Die HUVEC-Zelllinie besaß jedoch eine geringere Proteinkonzentration (Ergebnisse nicht gezeigt), wodurch in dem HUVEC-Ansatz mehr Zellen eingesetzt wurden. Dies führte wahrscheinlich zum Überladen der *Beads*. Dieses Ergebnis zeigt jedoch, dass die hTR an die PS-beschichteten *Beads* unspezifisch bindet, und die wahrscheinliche Ursache für den Hintergrund ist.

Eine weitere Möglichkeit wäre, neben der Vorfiltration, zusätzlich die eingesetzte Menge der PS-beschichteten *Beads* in der Inkubation zu reduzieren. Da 67,5 µl beschichtete *Beads* ausreichen, um die Telomerase aus  $0,5 \times 10^6$  Jurkat-Zellen vollständig zu binden (s. **Abb. 37** in **3.4.2.2**), sollte eine viel geringere Menge *Beads*, z.B. 10 µl, die Telomerase aus  $2 \times 10^4$  Zellen binden können. Dadurch wäre es vielleicht möglich, auch wenn die hTR nicht vollständig im Vorfiltrationsschritt entfernt wird, eventuelle unspezifische Bindungen der hTR-Reste im Inkubationsschritt zu verringern bzw. zu verhindern, da eine kleinere Oberfläche für diese unspezifischen Bindungen zur Verfügung stehen würde.

Nachdem die optimalen Versuchsbedingungen gefunden wurden, bei denen kein Hintergrund auftrat, wurde die Nachweisgrenze ermittelt. Mit dem entwickelten Assay zum Nachweis der humanen Telomerase gelang der Nachweis von **75** Zellen. Dieser neue Assay ist in seiner Sensitivität vergleichbar mit den in **Tabelle 1** aufgelisteten Assays.

Er hat folgende Vorteile bzw. Nachteile verglichen mit den anderen Assays aus **Tabelle 1** :

#### **Vorteile :**

- Sensitiv : erfolgreicher Nachweis von 75 Zellen
- Nicht-radioaktiv im Gegensatz zum klassischen TRAP, dem direkten Assay und dem TRAP-SPA



- Benötigt keine teuren Geräte wie Real-Time-PCR-Gerät (Real-Time TRAP), Fluoreszenzmikroskop (*In situ* TRAP), Luminometer (ELIPA), Fiber-Optik Gerät (Optischer Biosensor) oder BIACORE-Gerät (TRE)
- Benötigt keine speziell-markierten Komponenten wie die Amplifluor® Primer im TRAPeZe® XL Telomerase *Detection* Kit und TRAPeZe® RT Telomerase *Detection* Kit (Real-Time TRAP), oder die AE-markierte Sonde im TMA/HPA
- Teilweise automatisierungsfähig, wodurch ein hoher Durchsatz möglich wäre

#### Nachteile :

- Zeitintensiv : in der optimierten Endversion dauert der neue Telomerase-Assay ca. 11 h
- Kosten der UltraLink® Immobilized NeutrAvidin™ Protein Plus *Beads* : 11,9 € / Ansatz

Die aufgelisteten Nachteile könnten mit *Magnetbeads*, kovalent gekoppelt an ein PS-Oligonukleotid, umgangen werden (s. 4.5).

In **Tabelle 12** ist der entwickelte Telomerase-Assay mit den Telomerase Detektions Kits, die es auf dem Markt gibt, verglichen.

Test	Sensitivität [Zellen]	Zeit [h]	Kosten / Ansatz	Hersteller
<b>Neuer Assay</b>	<b>75</b>	<b>11</b>	<b>&gt; 11,9 €</b>	<b>diese Arbeit</b>
<b>TRAPeZe® Tel. Det. Kit</b>	50	k.A.	4,9 €	Chemicon*
<b>TRAPeZe® RT Tel. Det. Kit</b>	50	k.A.	3,2 €	Chemicon*
<b>TRAPeZe® XL Tel. Det. Kit</b>	100	k.A.	4,9 €	Chemicon*
<b>TRAPeZe® ELISA Tel. Det. Kit</b>	30	ca. 6	7,3 €	Chemicon*
<b>TeloExpress Quantitative Tel. Det Kit</b>	80	k.A.	4,8 €	XpressBio
<b>Quantitative Tel. Det. Kit (QTD Kit)</b>	1-5	k.A.	3,7 \$	US Biomax
<b>Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA</b>	> 10	6-8	6,7 €	Roche
<b>Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup></b>	< 10	ca. 7	7,5 €	Roche

**Tabelle 12:** Vergleich der Telomerase Detektions Kits, die auf dem Markt vertrieben werden, mit dem entwickelten neuen Telomerase-Assay. \* : Chemicon ist Teil von Millipore. Abkürzungen: **k.A.** : keine Angaben, **Tel. Det. Kit** : Telomerase *Detection* Kit.

Der entwickelte Assay zum Nachweis der humanen Telomerase ist in seiner Sensitivität vergleichbar mit den Telomerase Detektions Kits, die auf dem Markt vertrieben werden. In Zeit und Kosten liegt er darüber, was jedoch in einer Weiterentwicklung des Assays verbessert werden könnte (s. 4.5).

Im Gegensatz zu den TRAP-basierenden Assays, beschrieben in **Tabelle 1**, und den Kits aus **Tabelle 12**, wird in dem neuen Assay nicht die Telomerase-Aktivität bestimmt, d.h. nicht die Produkte der Telomerase-Reaktion detektiert. Hier werden die beiden Bestandteile des Telomerase-Moleküls (hTERT und hTR), welche mindestens für die Telomerase-Aktivität notwendig sind [104], nachgewiesen. Während mögliche Inhibitoren der *Taq* DNA Polymerase, welche in vielen Zell- und Gewebeextrakten vorhanden sind, im TRAP-Assay zu einem falsch-negativem Ergebnis führen können, wird der neue Assay durch solche Substanzen nicht gefährdet. Durch die extensiven Waschschrte nach der Immobilisierung der Telomerase an die Festphase werden unerwünschte Substanzen ausgewaschen, in der nachfolgenden RNA-Isolierung wird die hTR zusätzlich gewaschen, so dass keine Inhibitoren in die RT-PCR gelangen können sollten.

Im TRAP-Assay können in Abhängigkeit von der Sequenz des eingesetzten *reverse* Primers, falsch-positive Ergebnisse durch Primer-Dimer Bildung entstehen [137]. Im neuen Telomerase-Assay führen unspezifischen Produkte der RT-PCR nicht zu falsch-positiven Assays, da die Nebenprodukte eindeutig von dem eigentlichen PCR-Produkt zu unterscheiden sind.

## 4.5 Aussichten

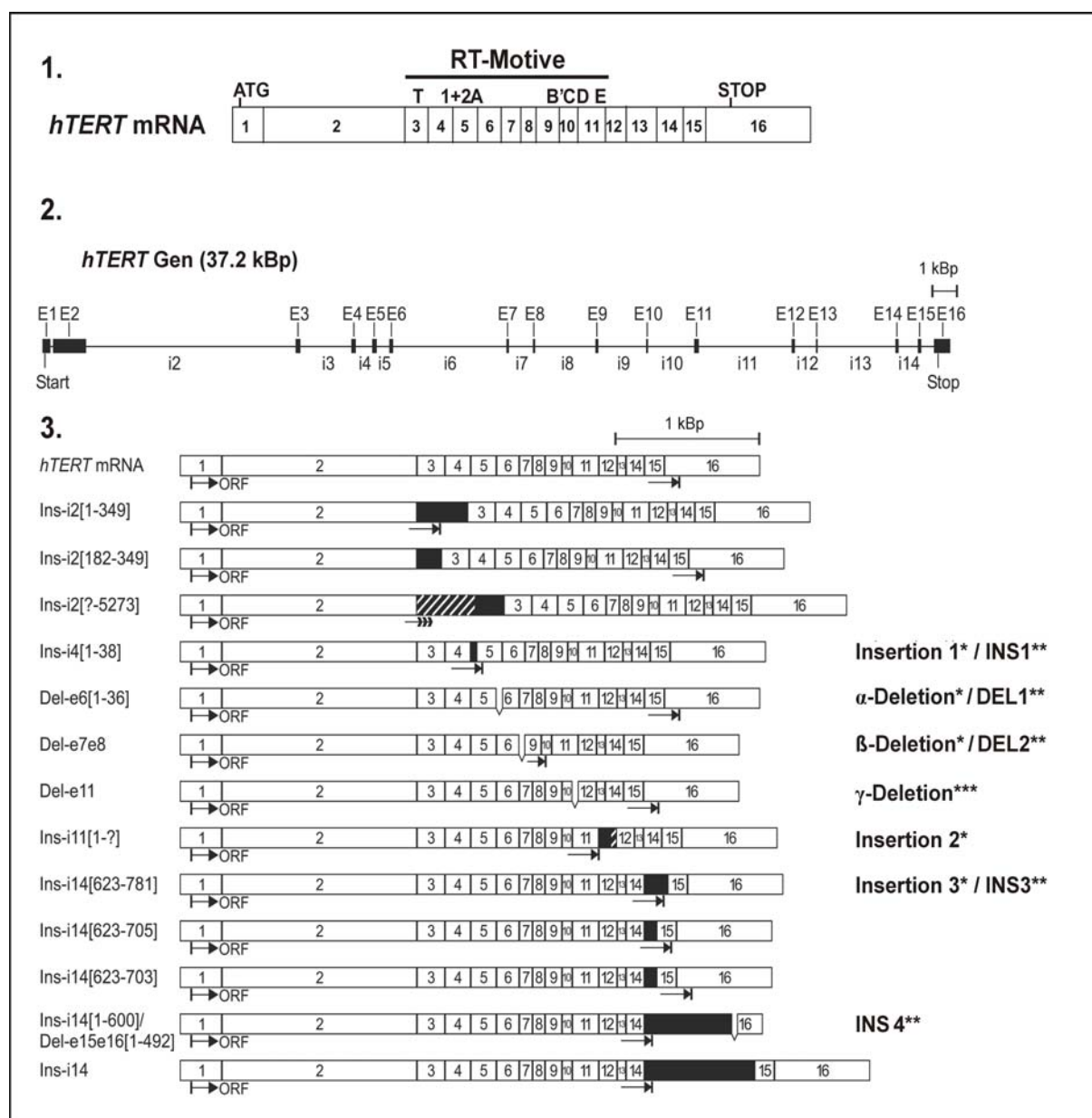
In der vorliegenden Arbeit wurde ein sensitiver Assay zum Nachweis der humanen Telomerase entwickelt. Mit dem Assay wurden Zell- bzw. Zellkernextrakte aus drei Zelllinien (Jurkat, HUVEC, HeLa) analysiert. Da unterschiedliche Zelllinien unterschiedlichen hTR-Gehalt und Telomerase-Aktivität besitzen [17,105], müssten zusätzlich viele unterschiedliche Zelllinien, Telomerase-positive wie -negative, untersucht werden. Es könnte von Nutzen sein, weniger Zellen als Ausgangsmaterial einzusetzen, und die Menge der PS-beschichteten *Beads* in der Inkubation zu reduzieren. Auf diese Weise würde die freie hTR mit noch größerer Effektivität in der Vorinkubation gebunden werden bzw. Reste von freier hTR, die in die

Inkubation gelangen, eventuell nicht an die *Beads* binden, und somit könnten falsch-positive Ergebnisse, wie mit der HUVEC-Zelllinie (s. 3.4.2.3), eliminiert werden. Die Kontrolle (unbeschichtete *Beads* in der Inkubation) sollte bei den verschiedenen Zelllinientests mitgeführt werden, sowie unterschiedliche Ausgangsmengen (zw.  $1 \times 10^4$  und  $2 \times 10^4$  Zellen). Hiermit würde auch bei den hTR-reichen Zelllinien die Chance bestehen, ein „Hintergrund-freies“ Ergebnis detektieren zu können. Durch den Vergleich der Telomerase-Assays mit den unterschiedlichen Zelllinien, würde man die optimale Ausgangszellmenge finden, bei der auch von hTR-reichen Zelllinien kein Hintergrund-Signal detektierbar ist. Mit dieser Zellzahl als Ausgangsmaterial könnten dann Zell- bzw. Gewebeextrakte mit unbekanntem Telomerase-Gehalt analysiert werden.

Um den neuen Assay in der Analyse von klinischen Proben einzusetzen, müssen noch folgende Fragen geklärt werden :

### **1. Können die alternativen Spleißformen der hTERT an dem Assay teilnehmen ?**

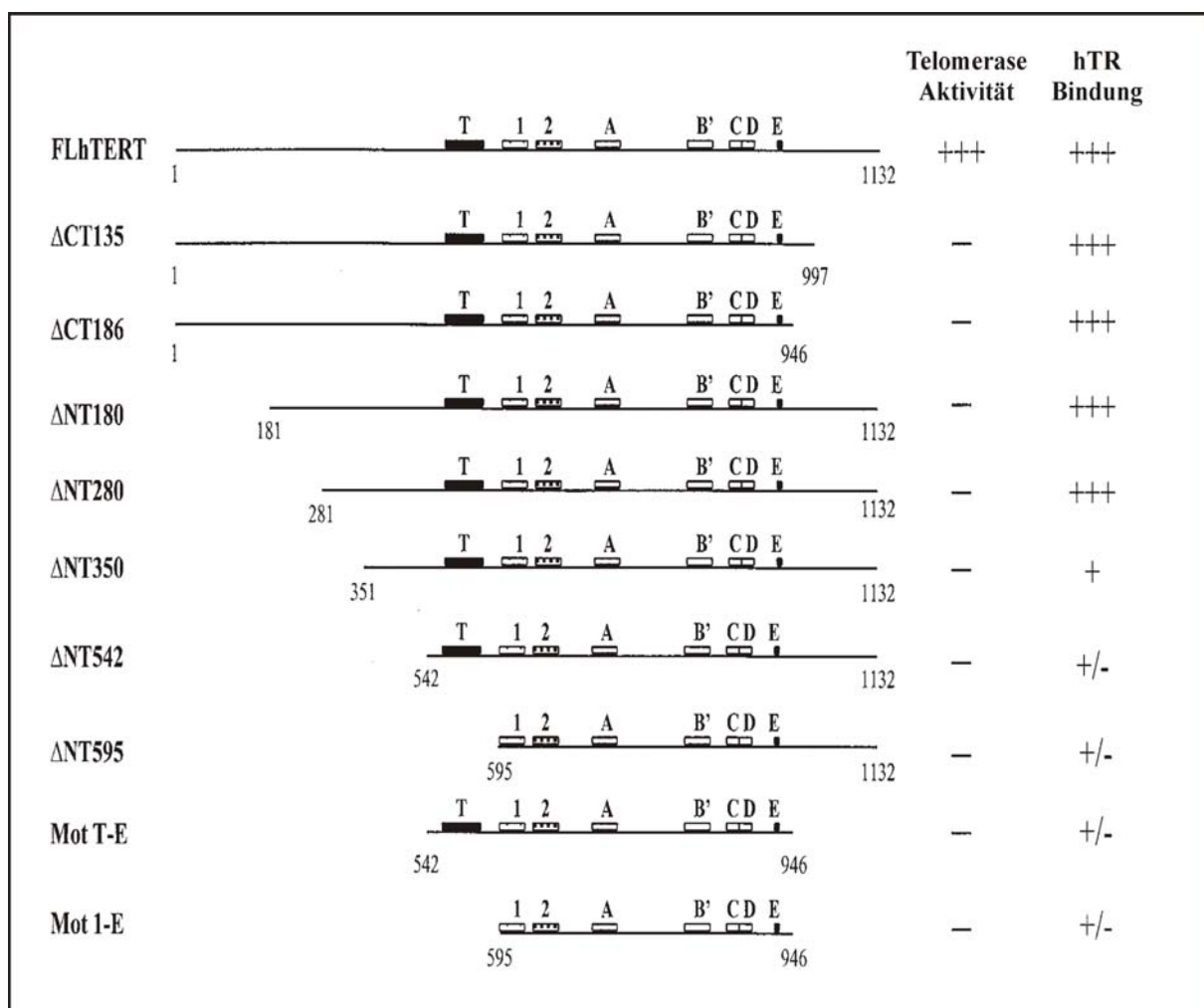
Das *hTERT*-Gen besteht aus 16 Exons und umfasst ca. 37 kBp genomischer DNA, von welcher ca. 33 kBp auf intronische Sequenzen fallen, und die restlichen ca. 4 kBp dem *hTERT* mRNA-Transkript entsprechen [240]. In **Abb. 42** ist eine Übersicht der alternativen Spleißstellen (ASS) gezeigt. Ein Teil der ASS, wie z.B. die Del-e7e8 ( $\beta$ -Deletion) und die Ins-i4[1-38] (Insertion 1), verursachen einen vorzeitigen Translations-Abbruch, *upstream* von den essentiellen hTERT RT-Motiven [10,11,241]. Andere, wie die Del-e6[1-36] ( $\alpha$ -Deletion), verursachen eine 36 Bp-Deletion innerhalb des RT-Motivs A, ohne zu einem vorzeitigen Translations-Abbruch zu führen [240,242]. Da die RT-Motive für die Telomerase-Aktivität erforderlich sind [10,11,241], haben diese alternative Spleißvarianten keine katalytische Aktivität. Andere Insertionen, wie z.B. Ins-i11[1-?] (Insertion 2) und Ins-i14[623-781] (Insertion 3), finden *downstream* von den RT-Motiven statt und führen zu Verkürzungen des Proteins. Es wurde gezeigt, dass manche C-terminale Modifikationen die Telomerase in ihrer Fähigkeit die Telomerlänge zu erhalten, stören [243,244], so dass diese Insertions-Spleißvarianten unter Umständen nicht zu biologisch funktionellen Proteinen führen [17].



**Abb. 42:** 1.: Schematische Darstellung der *full-length hTERT* mRNA. Die Position der RT-Motive (T, 1 und 2, A, B', C, D und E) ist über dem mRNA-Schema gezeigt (modifiziert nach [245]). 2.: Exon/Intron-Aufbau des *hTERT* Gens [240]. Die Exons sind als schwarze Boxen mit Nummerierungen über den Boxen dargestellt. Der Start bzw. Stop bezeichnen den Anfang und Ende des ORFs. 3.: Schematische Darstellung der ASS der *hTERT* mRNA. Die Exons sind als weiße, nummerierte Boxen abgebildet, die schwarzen Boxen sind intronische Sequenzen, und mit der Strichelung sind uncharakterisierte 5' oder 3' Spleißstellen gekennzeichnet. Der ORF ist unter den Abbildungen mit Pfeilen angezeigt. Den *hTERT* ASS wurden beschreibende Namen zugeteilt : Ins-i, Insertion intronischer Sequenz; Del-e, Deletion exonischer Sequenz; gefolgt von der Intron/Exon Nummer, und in eckigen Klammern einen Nukleotid-Bereich, wenn die Insertion/Deletion einen Teil des Introns/Exons umfasst. Die früher benutzten Bezeichnungen der ASS (\* [242], \*\* [240], \*\*\* [246]) sind auf der rechten Seite gezeigt (modifiziert nach [247]).

Es gibt keine Hinweise in der Literatur, ob die Translation der unterschiedlichen alternativen Spleißvarianten in der Zelle stattfindet, und wenn ja, wie hoch diese Translationrate im Vergleich zu der Translation der *full-length hTERT* mRNA ist, und ob diese Proteine stabil sind.

Wenn die alternativen Spleißvarianten jedoch translatiert werden und die synthetisierten Proteine stabil sind, dann müssten diese Proteine den N-Terminus der hTERT besitzen. Bachand und Autexier [248] haben unterschiedliche N- und C-terminale Deletionen der hTERT auf ihre Fähigkeit die hTR zu Binden, sowie deren katalytische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 43** gezeigt.



**Abb. 43:** Analyse der Fähigkeit der N- und C-terminalen hTERT-Verkürzungen die Telomerase-Aktivität wiederherzustellen und hTR *in vitro* zu binden. Die hTERT wurde mit den RT-Motiven schematisch abgebildet [10]. Abkürzungen: **FL** : *full-length* (modifiziert nach [248]).

Obwohl die N- und C-terminalen Verkürzungen keine katalytische Aktivität besitzen, können die hTERT-Verkürzungen, die den ganzen oder Teile vom N-Terminus besitzen, die hTR binden.

Dies könnte bedeuten, dass, falls die alternativen Spleißformen translatiert werden, diese auch hTR binden könnten. Da sich bei den meisten Spleißformen der Stop des ORF nach den RT-Motiven befindet, könnten Proteine synthetisiert werden, welche eine ähnliche Struktur wie **ΔCT135** oder **ΔCT186** in **Abb. 43** besitzen, und diese können die hTR sehr gut binden.

Wyatt et al. [123] haben mit ihren Ergebnisse die Hypothese, dass der N-Terminus der hTERT die *anchor site* enthält, bestärkt.

Da PS-Oligonukleotide die Telomerase an der *anchor site* binden [205], könnten sie auch hTERT-Verkürzungen binden, welche den N-Terminus besitzen, wie z.B. die translatierten alternativen Spleißformen. Falls diese Spleißformen ihrerseits Interaktionen mit der hTR eingehen können, dann würden die PS-Oligonukleotide über die Spleißformen die hTR binden. Auf diese Weise würden diese alternativen Spleißformen im Telomerase-Assay theoretisch ein Signal geben, welches nicht aus katalytisch aktiver Telomerase ausgeht. Dies würde zu falsch-positiven Signalen führen.

Um diese Fragen zu klären, müsste zuerst bestimmt werden, ob die alternativen Spleißformen überhaupt translatiert werden. Hierzu könnten Antikörper, gerichtet gegen die einzelnen Spleißformen, eingesetzt werden. Mit diesen könnte dann z.B. im Western-Blot versucht werden, die endogenen Levels der unterschiedlichen Spleißformen in verschiedenen Zell- und Gewebeextrakten zu analysieren.

Um zu bestimmen, ob die alternativen Spleißformen die hTR binden können, könnten die Sequenzen für die unterschiedlichen Varianten subkloniert und überexprimiert werden. Mit verschiedenen Methoden, wie z.B. Immunpräzipitation, könnte getestet werden, ob diese aufgereinigten Proteine die hTR bzw. PS-Oligonukleotide binden. Diese Versuche könnten Hinweise liefern, ob die Spleißformen an dem Telomerase-Assay teilnehmen könnten.

Yi et al. [17], Nagao et al. [226] und Hisatomi et al. [246] haben verschiedene Zelllinien auf unterschiedliche alternative Spleißformen getestet. Bei allen normalen, Telomerase-negativen Zelllinien wurde weder die *full-length hTERT* mRNA, noch eine der nachzuweisenden Spleißformen gefunden. In solchen Fällen, sollte mit dem neuen Telomerase-Assay eine

eindeutige Unterscheidung zwischen Telomerase-positiven und negativen Proben gemacht werden können.

Fan et al. [249] haben Grawitz-Tumor Proben, sowie das benachbarte gesunde Gewebe (Kontrollprobe) von 33 Patienten auf Telomerase-Aktivität und alternative Spleißformen der *hTERT* mRNA untersucht. In 32 der 33 Tumor-Proben wurden alternative Spleißformen detektiert, jedoch nur 27 der Proben besaßen die *full-length hTERT* mRNA und Telomerase-Aktivität. Die Kontrollproben zu diesen 27 Proben wiesen keine Telomerase-Aktivität auf. In 14 der 33 Kontrollproben wurden alternative Spleißformen nachgewiesen, jedoch in keiner Telomerase-Aktivität oder die *full-length hTERT* mRNA.

Saeboe-Larssen et al. [247] haben auch in Tumoren, sowie benachbartem Kontrollgewebe alternative Spleißformen gefunden.

Falls die unterschiedlichen Spleißformen am Telomerase-Assay teilnehmen könnten, muss in solchen Fällen immer eine Probe aus dem Tumor, sowie dem benachbarten gesunden Gewebe genommen werden, und beide mit dem Telomerase-Assay analysiert werden. Es müsste eine exakte Quantifizierung der Proben vorgenommen werden (s. 3. in 4.5), und der Wert des gesunden Gewebes als Hintergrund vom Tumor-Wert abgezogen werden.

## **2. Wie stellt man die Ausgangsmenge der Proben, die im Telomerase-Assay eingesetzt werden, ein : nach Zellzahl oder Proteingehalt ?**

In den Versuchen zur Optimierung des Telomerase-Assays wurde die Ausgangsmenge nach Zellzahl eingestellt. Dies war notwendig, um die Nachweisgrenze dieser Methode zur Ermitteln. Die Einstellung nach Zellzahl könnte bei der Analyse von Zellextrakten angewandt werden. Da mit diesem Assay jedoch auch Gewebeextrakte analysiert werden sollen, wird es notwendig sein, die Ausgangsmengen in diesen Proben nach Proteingehalt einzustellen. Es muss berücksichtigt werden, dass die unterschiedlichen Zelllinien, unterschiedliche Proteinmengen enthalten können (Beispiele in [250,251] gezeigt). Aus diesem Grund müssen bei den weiterführenden Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Telomerase-positiven und negativen Zelllinien, die eingesetzten Zellzahlen, sowie der Proteingehalt der Proben bestimmt werden. Wie bei der Bestimmung der optimalen Zellzahl als Ausgangsmenge, muss ein optimaler Proteingehalt ermittelt werden. In dem Telomerase-Assay zur Analyse von

Gewebeextrakten, muss dann  $\leq$  als die optimale Proteinmenge eingesetzt werden, um kein Hintergrund-Signal zu detektieren.

### 3. Wie könnten die Zeit und die Kosten für den Assay minimiert werden ?

Der neue Assay zum Nachweis der humanen Telomerase in Zell- oder Gewebeextrakten, findet in folgenden Schritten statt :

- A) Lysatherstellung (50 min)
- B) Immobilisierung an PS-beschichtete UltraLink<sup>®</sup> Immobilized NeutrAvidin<sup>™</sup> Protein Plus Beads (200 min)
- C) RNA-Isolierung inkl. DNaseI-Verdau (80 min)
- D) Reverse-Transkriptase-PCR (320 min)

Die einzelnen Schritte könnten folgendermaßen modifiziert werden, um die Assay-Zeit und Kosten zu senken :

- A) **Lysatherstellung** : Durch den Einsatz von speziellen Lysisreagenzien wie z.B. M-PER<sup>®</sup> *Mammalian Protein Extraction Reagent* (für Zellen) bzw. T-PER<sup>®</sup> *Tissue Protein Extraction Reagent* (für Gewebe) der Firma Pierce können die Zeit und der Aufwand für die Lysatherstellung gekürzt werden. Die Zeit für die Lysatherstellung würde 10-15 min (für die Lysis von Zellen, die in Monolayer wachsen), 25 min (für die Lysis von Zellen, die in Suspension wachsen), oder 5 min (für Gewebe) betragen. Dadurch würde dieser Schritt 2-10 x schneller verlaufen als die Lysatherstellung mit den neuen Bedingungen (s. Abb. 34 in 3.4.2.1).
- B) **Immobilisierung an die Festphase** : Der Hintergrund, bedingt durch unspezifische Bindungen an die *Beads*, stellte das größte Problem bei der Entwicklung dieses Assays dar. Die *Beads* waren auch die teuerste Assay-Komponente. Die Immobilisierung der Telomerase an die Festphase, welche der arbeitsintensivste und einer der längsten Schritte des Telomerase-Assays ist, könnte mit Hilfe neuer *Beads* sehr stark gekürzt werden. Zu diesem Zweck müssten *Beads* hergestellt werden, welche folgende Kriterien erfüllen :



a) Magnetische Eigenschaften besitzen. Durch den Einsatz von *Magnetbeads* würde die Notwendigkeit einer Zentrifuge entfallen, und die Waschschriffe würden weniger Zeit in Anspruch nehmen.

b) An ein PS-Oligonukleotid gekoppelt sind. Ein längeres PS-Oligonukleotid als in der Arbeit eingesetzt, z.B. ein 30mer, könnte von Vorteil sein. Das PS-Oligonukleotid sollte an den *Beads* durch einen Spacer gekoppelt sein. Dadurch würde die Zugänglichkeit eventuell verbessert (s. 4.2.2), und die Bindung der Telomerase an die beschichteten *Beads* noch effektiver werden. Dadurch könnten weniger *Beads* notwendig sein, und eine bessere Bindung könnte auch zu einer Verkürzung der Inkubations- und dadurch der Gesamt-Assay-Zeit führen. Wenn es gelingen würde, solche PS-gekoppelten *Beads* zu produzieren, würde der Beschichtungsschritt entfallen, und eine konstante Qualität der *Beads* wäre gewährleistet.

c) Gut geblockt sind. Die *Beads* sollten keine Proteine und Nukleinsäuren binden. Wenn PS-gekoppelte *Magnetbeads* herzustellen wären, die keine RNA binden, würde der Vorinkubationsschritt entfallen. Auf diese Weise würde der Assay um mehr als 1,5 h gekürzt werden.

d) Billig sind. Durch den Einsatz von *Magnetbeads*, welche die Kriterien a)-c) erfüllen, würden auch weitere erhebliche Kosten, wie z.B. für die Spincolumns, die in den Inkubations- und Waschschriffen benutzt werden, wegfallen. Dadurch wäre es denkbar, die Gesamtkosten für den Telomerase-Assay so zu senken, dass sie vergleichbar mit den anderen Kits auf dem Markt werden.

C) **RNA-Isolierung** : Dieser Schritt könnte vielleicht umgangen werden. Nach der Immobilisierung der Telomerase an die PS-gekoppelten *Magnetbeads* und intensivem Waschen, könnte sofort ein DNase-Verdau an den *Beads* durchgeführt werden. Stefanovic et al. [252] haben einen erfolgreichen DNase-Verdau in Gegenwart von *Magnetbeads* beschrieben. Sie haben ein biotinyliertes, doppelsträngiges DNA-Fragment an Streptavidin-beschichtete *Magnetbeads* immobilisiert, und dann mit Protein-Proben versetzt. Nach der Inkubation der DNA-beschichteten *Magnetbeads* mit den Proteinen, wurden die *Magnetbeads* von der restlichen Lösung abgetrennt, gewaschen, und die Proteine, welche DNA-gebunden waren, freigesetzt. Dies wurde durch Erwärmen mit SDS-Probenpuffer (30 min/37 °C) oder einen DNase-Verdau erreicht. Mit den

*Magnetbeads* mit immobilisierter Telomerase könnte nach dem letzten Waschschrift ein DNaseI-Verdau durchgeführt werden. Im Anschluss an dem DNaseI-Verdau, folgt eine Hitzeinaktivierung der DNaseI. Dies wird durch Inkubation der Probe bei 65°C für 10 min erreicht. Im selben Schritt sollte auch die Telomerase in ihre Komponenten zerfallen (mind. hTR und hTERT), da diese Bedingungen ausreichen, um die Telomerase zu inaktivieren [253]. Dadurch würde die hTR freigesetzt, und nach Abtrennung der *Magnetbeads*, könnte der Ansatz direkt in die RT-PCR gegeben werden. Es könnte sein, dass die Proteine, die an die PS-gekoppelten *Magnetbeads* mitgebunden werden (Heparin-bindende Proteine), und bei dem 65°C-Schritt auch in die Lösung gelangen könnten, die nachfolgende RT-PCR stören. Dann könnte nach dem DNase-Verdau, ohne die DNase zu inaktivieren, eine Proteinase K-Behandlung der Probe erfolgen. Durch diesen Schritt würden alle Protein-Komponenten an den *Beads*, sowie die DNase im Ansatz entfernt, und die hTR freigesetzt werden. Nach Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 65 °C, könnte der ganze Ansatz in die RT-PCR gegeben werden. Durch diese Schritte (DNase-Verdau / DNase-Verdau + Proteinase K-Behandlung) könnte die RNA-Isolierung ersetzt werden, wodurch die Assay-Kosten, und die Assay-Zeit um ca. 40 min reduziert werden könnten.

- D) Reverse-Transkriptase-PCR** : Der letzte Schritt des Telomerase-Assays stellte eine Reverse-Transkriptase-PCR dar. Die RT-PCR war eine Zwei-Schritt-Reaktion. Zuerst wurde aus der isolierten RNA mit *Random Hexamer* Primer cDNA hergestellt, welche dann mit Gen-spezifischen Primern amplifiziert wurde. Die reverse Transkription und die PCR fanden als separate Reaktionen statt. Die RT-PCR kann auch als Ein-Schritt-Reaktion ausgeführt werden. Hier finden die reverse Transkription und die PCR in demselben Ansatz statt, und die Gen-spezifischen Primer werden in beiden Reaktionen genutzt. Die Vorteile der Ein-Schritt RT-PCR sind, dass sie schneller, nicht so teuer und mit weniger Arbeitsschritten verbunden ist, wodurch die Gefahr von Fehlern (Pipettierfehler, Kontaminationen, usw.) reduziert wird. Der Nachteil der Ein-Schritt RT-PCR ist, dass durch den Gebrauch von Gen-spezifischen Primern, nur ein Gen / Ansatz amplifiziert werden kann. Um andere Gene, die von Interesse sein könnten, analysieren zu können, muss die ursprüngliche RNA aliquotiert und gelagert werden [254]. Da jedoch im Telomerase-Assay nur die hTR detektiert wird, hat dieser Nachteil der Ein-Schritt RT-PCR keine Bedeutung für den Assay. Die RT-PCR könnte als Real-Time RT-PCR durchgeführt

werden. Hierzu würde ein Real-Time-Gerät notwendig sein, diese Änderung würde jedoch eine exakte Quantifizierung der Proben ermöglichen. Außerdem würden alle post-PCR Schritte (Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Färbung des Gels) entfallen, wodurch die Assay-Zeit um weitere 2,5 h gekürzt werden könnte. Die Real-Time RT-PCR könnte auch als Ein-Schritt-Reaktion ausgeführt werden. Dadurch würde das Telomerase-Assay noch schneller werden. Während in dem entwickelten Assay ca. 3 h für die reverse Transkription und die anschließende PCR benötigt werden, und zusätzliche 2,5 h für die post-PCR Schritte, könnte z.B. mit dem QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR Kit oder QuantiFast™ Probe RT-PCR Kit der Firma Qiagen, die gesamte RT-PCR (inklusive Analyse) in weniger als 1 h abgeschlossen werden.

Mit den aufgezählten Änderungen könnte der Telomerase-Assay in folgenden Schritten durchgeführt werden :

- A) Lysatherstellung mit Lysisreagens ( $\leq 25$  min)
- B) Immobilisierung an PS-gekoppelte *Magnetbeads* (110 min)
- C) DNaseI-Verdau +/- Proteinase K-Verdau (40 – 70 min)
- D) Ein-Schritt Real-Time RT-PCR ( $\leq 60$  min)

Mit diesen Modifikationen würde der Telomerase-Assay in 4-4,5 h durchführbar sein, und nicht nur in der Sensitivität, sondern in der Assay-Dauer, vergleichbar mit den meisten kommerziellen Telomerase Detektionskits.

Mit *Magnetbeads*, die den obigen Kriterien entsprechen, könnte die Empfindlichkeit des Assays vielleicht erhöht werden. Da die Vorinkubation entfallen würde, könnten eventuelle Verluste an Telomerase in diesem Schritt verhindert werden. Zusätzlich könnte die RT-PCR weiter optimiert werden.

Ein anderer großer Vorteil solcher *Beads* wäre, dass, wenn die ganze hTR aus der immobilisierten Telomerase in die Real-Time RT-PCR eingesetzt werden könnte, viel weniger Ausgangsmaterial für den Assay notwendig wäre. Dadurch könnten mikroskopisch kleine Proben untersucht werden.

Mit Hilfe von *Magnetbeads* könnte der Assay auch größtenteils automatisiert werden. Nach der Lysatherstellung, welche manuell durchgeführt wird, könnten alle nachfolgenden Schritte automatisch verlaufen. Dies könnte z.B. mit den KingFisher® Magnetpartikel Prozessoren der Firma Thermo Fisher Scientific erfolgen. Mit diesen Geräten können bis zu 96 Proben gleichzeitig bearbeitet werden, was einen hohen Durchsatz des Assays garantieren würde.

Mit den beschriebenen Änderungen könnte der entwickelte sensitive Assay zum Nachweis der humanen Telomerase so optimiert werden, dass er schnell und billig wird. Dadurch könnte er zur Analyse von Biopsieproben in der Klinik eingesetzt werden, um den wichtigen diagnostischen und prognostischen Marker Telomerase zu detektieren.

Der neue Telomerase-Assay könnte auch mit einer cytogenetischen Methode wie CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) oder *array* CGH kombiniert werden. Loveday et al. [255] haben 33 Brustkarzinome mit dem TRAP-Assay und der CGH untersucht. Es wurden 4 chromosomale Regionen identifiziert, welche mit dem Telomerase-Status des Tumors korrelierten. *Gain* von 1q korrelierte mit Telomerase-negativen Tumoren, *gain* von 3q und die Deletion von 17p mit hohen Telomerase-Aktivitäts Level. *Gain* von 8q korrelierte mit Telomerase-positiven Tumoren und innerhalb dieser Gruppe mit hohen Telomerase-Aktivitäts Level. Die CGH-Analyse von Brusttumoren in Verbindung mit dem Telomerase Status unterstützte frühere Ergebnisse, die auf die Beteiligung der *hTR* [256], *c-myc* [257] und *p53* Gene [258] in der Kontrolle der Telomerase-Aktivität deuten. Diese Gene befinden sich auf den Chromosomen 3q, 8q und 17p. Außerdem wurde gezeigt, dass Gene auf Chromosom 1q in der Telomerase-Expression involviert sind.

Saretzki et al. [259] haben die hTERT Gendosis auf Chromosom 5p15 in 20 Lungenkrebs-Zelllinien untersucht, um bessere Einsicht in den Mechanismen der Telomerase-Hochregulation während der Tumorbildung zu erhalten. Hierzu wurden FISH (*Fluorescence In Situ-Hybridization*), Southern Blotting und CGH eingesetzt, und die genetischen Analysen in Korrelation zu der hTERT Expression, Telomerase-Aktivität und Telomerlänge gesetzt. Sie haben eine signifikante Korrelation zwischen der hTERT Gendosis, hTERT mRNA Expression und Telomerase-Aktivität gefunden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Gendosis-Effekte eine wichtige Rolle bei der Regulation der Telomerase-Aktivität in Lungenkrebszellen spielen.

## 5. Literatur

- [1] Olovnikov, A. M. (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J Theor Biol* 41 [1], pp. 181-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4754905](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4754905)
- [2] Watson, J. D. (1972): Origin of concatemeric T7 DNA, *Nat New Biol* 239 [94], pp. 197-201. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4507727](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4507727)
- [3] Harley, C. B.; Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature* 345 [6274], pp. 458-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2342578](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2342578)
- [4] Wright, W. E. and Shay, J. W. (1992): The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization, *Exp Gerontol* 27 [4], pp. 383-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1333985](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1333985)
- [5] Lingner, J. and Cech, T. R. (1998): Telomerase and chromosome end maintenance, *Curr Opin Genet Dev* 8 [2], pp. 226-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9610414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9610414)
- [6] Feng, J.; Funk, W. D.; Wang, S. S.; Weinrich, S. L.; Ailion, A. A.; Chiu, C. P.; Adams, R. R.; Chang, E.; Allsopp, R. C.; Yu, J. and et al. (1995): The RNA component of human telomerase, *Science* 269 [5228], pp. 1236-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7544491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7544491)
- [7] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts, *Cell* 43 [2 Pt 1], pp. 405-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3907856](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3907856)
- [8] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1989): A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis, *Nature* 337 [6205], pp. 331-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2463488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2463488)
- [9] Meyerson, M.; Counter, C. M.; Eaton, E. N.; Ellisen, L. W.; Steiner, P.; Caddle, S. D.; Ziaugra, L.; Beijersbergen, R. L.; Davidoff, M. J.; Liu, Q.; Bacchetti, S.; Haber, D. A. and Weinberg, R. A. (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization, *Cell* 90 [4], pp. 785-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9288757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9288757)
- [10] Nakamura, T. M.; Morin, G. B.; Chapman, K. B.; Weinrich, S. L.; Andrews, W. H.; Lingner, J.; Harley, C. B. and Cech, T. R. (1997): Telomerase catalytic subunit

- homologs from fission yeast and human, *Science* 277 [5328], pp. 955-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9252327](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9252327)
- [11] Lingner, J.; Hughes, T. R.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Lundblad, V. and Cech, T. R. (1997): Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase, *Science* 276 [5312], pp. 561-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9110970](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9110970)
- [12] Shay, J. W. and Bacchetti, S. (1997): A survey of telomerase activity in human cancer, *Eur J Cancer* 33 [5], pp. 787-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9282118](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9282118)
- [13] Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L. and Shay, J. W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science* 266 [5193], pp. 2011-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7605428](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7605428)
- [14] Hahn, W. C.; Counter, C. M.; Lundberg, A. S.; Beijersbergen, R. L.; Brooks, M. W. and Weinberg, R. A. (1999): Creation of human tumour cells with defined genetic elements, *Nature* 400 [6743], pp. 464-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10440377](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10440377)
- [15] Hahn, W. C.; Stewart, S. A.; Brooks, M. W.; York, S. G.; Eaton, E.; Kurachi, A.; Beijersbergen, R. L.; Knoll, J. H.; Meyerson, M. and Weinberg, R. A. (1999): Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells, *Nat Med* 5 [10], pp. 1164-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10502820](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10502820)
- [16] Herbert, B.; Pitts, A. E.; Baker, S. I.; Hamilton, S. E.; Wright, W. E.; Shay, J. W. and Corey, D. R. (1999): Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [25], pp. 14276-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10588696](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10588696)
- [17] Yi, X.; Shay, J. W. and Wright, W. E. (2001): Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells, *Nucleic Acids Res* 29 [23], pp. 4818-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11726691](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11726691)
- [18] Hiyama, E. and Hiyama, K. (2003): Telomerase as tumor marker, *Cancer Lett* 194 [2], pp. 221-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12757980](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12757980)
- [19] Guvakova, M. A.; Yakubov, L. A.; Vlodavsky, I.; Tonkinson, J. L. and Stein, C. A. (1995): Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity

- binding sites on extracellular matrix, *J Biol Chem* 270 [6], pp. 2620-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7852327](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7852327)
- [20] Beneke, S. (2004): Telomere und Poly(ADP-Ribosyl)ierung: Nicht immer ist alles negativ, *BIOspektrum* [5/04], p. 657.
- [21] Cong, Y. S.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (2002): Human telomerase and its regulation, *Microbiol Mol Biol Rev* 66 [3], pp. 407-25, table of contents. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12208997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12208997)
- [22] Stewart, S. A. and Weinberg, R. A. (2006): Telomeres: cancer to human aging, *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, pp. 531-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16824017](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16824017)
- [23] Pendino, F.; Tarkanyi, I.; Dudognon, C.; Hillion, J.; Lanotte, M.; Aradi, J. and Segal-Bendirdjian, E. (2006): Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies?, *Curr Cancer Drug Targets* 6 [2], pp. 147-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16529544](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16529544)
- [24] Blackburn, E. H. (2001): Switching and signaling at the telomere, *Cell* 106 [6], pp. 661-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11572773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11572773)
- [25] de Lange, T. (2002): Protection of mammalian telomeres, *Oncogene* 21 [4], pp. 532-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11850778](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11850778)
- [26] Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2004): Regulation of telomerase by telomeric proteins, *Annu Rev Biochem* 73, pp. 177-208. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15189140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15189140)
- [27] Greider, C. W. (1999): Telomeres do D-loop-T-loop, *Cell* 97 [4], pp. 419-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10338204](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10338204)
- [28] Cesare, A. J. and Griffith, J. D. (2004): Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops, *Mol Cell Biol* 24 [22], pp. 9948-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15509797](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15509797)
- [29] Griffith, J. D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R. M.; Bianchi, A.; Moss, H. and de Lange, T. (1999): Mammalian telomeres end in a large duplex loop, *Cell* 97 [4], pp. 503-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10338214](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10338214)
- [30] Nikitina, T. and Woodcock, C. L. (2004): Closed chromatin loops at the ends of chromosomes, *J Cell Biol* 166 [2], pp. 161-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15249582](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15249582)

- [31] Munoz-Jordan, J. L.; Cross, G. A.; de Lange, T. and Griffith, J. D. (2001): t-loops at trypanosome telomeres, *Embo J* 20 [3], pp. 579-88. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11157764](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11157764)
- [32] Murti, K. G. and Prescott, D. M. (1999): Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [25], pp. 14436-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10588723](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10588723)
- [33] Oganessian, L. and Bryan, T. M. (2007): Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target, *Bioessays* 29 [2], pp. 155-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17226803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17226803)
- [34] Zhong, Z.; Shiue, L.; Kaplan, S. and de Lange, T. (1992): A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro, *Mol Cell Biol* 12 [11], pp. 4834-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1406665](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406665)
- [35] Ye, J. Z.; Donigian, J. R.; van Overbeek, M.; Loayza, D.; Luo, Y.; Krutchinsky, A. N.; Chait, B. T. and de Lange, T. (2004): TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres, *J Biol Chem* 279 [45], pp. 47264-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15316005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15316005)
- [36] Smith, S. and de Lange, T. (2000): Tankyrase promotes telomere elongation in human cells, *Curr Biol* 10 [20], pp. 1299-302. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11069113](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11069113)
- [37] Smith, S.; Gariat, I.; Schmitt, A. and de Lange, T. (1998): Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres, *Science* 282 [5393], pp. 1484-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9822378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9822378)
- [38] Ye, J. Z. and de Lange, T. (2004): TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex, *Nat Genet* 36 [6], pp. 618-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15133513](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15133513)
- [39] Kim, S. H.; Kaminker, P. and Campisi, J. (1999): TIN2, a new regulator of telomere length in human cells, *Nat Genet* 23 [4], pp. 405-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10581025](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10581025)
- [40] Liu, D.; Safari, A.; O'Connor, M. S.; Chan, D. W.; Laegeler, A.; Qin, J. and Songyang, Z. (2004): PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres, *Nat Cell Biol* 6 [7], pp. 673-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15181449](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15181449)
- [41] Ye, J. Z.; Hockemeyer, D.; Krutchinsky, A. N.; Loayza, D.; Hooper, S. M.; Chait, B. T. and de Lange, T. (2004): POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex, *Genes Dev* 18 [14], pp. 1649-54. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15231715](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15231715)
- [42] Kelleher, C.; Kurth, I. and Lingner, J. (2005): Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro, *Mol Cell Biol* 25 [2], pp. 808-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15632080](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15632080)
- [43] Colgin, L. M.; Baran, K.; Baumann, P.; Cech, T. R. and Reddel, R. R. (2003): Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase, *Curr Biol* 13 [11], pp. 942-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12781132](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12781132)
- [44] Zhou, X. Z. and Lu, K. P. (2001): The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor, *Cell* 107 [3], pp. 347-59. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11701125](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11701125)
- [45] Hsu, H. L.; Gilley, D.; Galande, S. A.; Hande, M. P.; Allen, B.; Kim, S. H.; Li, G. C.; Campisi, J.; Kohwi-Shigematsu, T. and Chen, D. J. (2000): Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining, *Genes Dev* 14 [22], pp. 2807-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11090128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11090128)
- [46] Lillard-Wetherell, K.; Machwe, A.; Langland, G. T.; Combs, K. A.; Behbehani, G. K.; Schonberg, S. A.; German, J.; Turchi, J. J.; Orren, D. K. and Groden, J. (2004): Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2, *Hum Mol Genet* 13 [17], pp. 1919-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15229185](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15229185)
- [47] Opresko, P. L.; von Kobbe, C.; Laine, J. P.; Harrigan, J.; Hickson, I. D. and Bohr, V. A. (2002): Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases, *J Biol Chem* 277 [43], pp. 41110-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12181313](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12181313)
- [48] Kishi, S.; Zhou, X. Z.; Ziv, Y.; Khoo, C.; Hill, D. E.; Shiloh, Y. and Lu, K. P. (2001): Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks, *J Biol Chem* 276 [31], pp. 29282-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11375976](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11375976)
- [49] Karlseder, J.; Hoke, K.; Mirzoeva, O. K.; Bakkenist, C.; Kastan, M. B.; Petrini, J. H. and de Lange, T. (2004): The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response, *PLoS Biol* 2 [8], p. E240. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15314656](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15314656)
- [50] Bilaud, T.; Brun, C.; Ancelin, K.; Koering, C. E.; Laroche, T. and Gilson, E. (1997): Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein, *Nat Genet* 17 [2], pp. 236-9. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9326951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9326951)
- [51] Broccoli, D.; Smogorzewska, A.; Chong, L. and de Lange, T. (1997): Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2, *Nat Genet* 17 [2], pp. 231-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9326950](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9326950)
- [52] Smogorzewska, A.; van Steensel, B.; Bianchi, A.; Oelmann, S.; Schaefer, M. R.; Schnapp, G. and de Lange, T. (2000): Control of human telomere length by TRF1 and TRF2, *Mol Cell Biol* 20 [5], pp. 1659-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10669743](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10669743)
- [53] Stansel, R. M.; de Lange, T. and Griffith, J. D. (2001): T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang, *Embo J* 20 [19], pp. 5532-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11574485](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11574485)
- [54] Li, B.; Oestreich, S. and de Lange, T. (2000): Identification of human Rap1: implications for telomere evolution, *Cell* 101 [5], pp. 471-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10850490](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10850490)
- [55] Matsutani, N.; Yokozaki, H.; Tahara, E.; Tahara, H.; Kuniyasu, H.; Kitadai, Y.; Haruma, K.; Chayama, K. and Yasui, W. (2001): Expression of MRE11 complex (MRE11, RAD50, NBS1) and hRap1 and its relation with telomere regulation, telomerase activity in human gastric carcinomas, *Pathobiology* 69 [4], pp. 219-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12007281](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12007281)
- [56] Bailey, S. M.; Meyne, J.; Chen, D. J.; Kurimasa, A.; Li, G. C.; Lehnert, B. E. and Goodwin, E. H. (1999): DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [26], pp. 14899-904. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10611310](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10611310)
- [57] Ranganathan, V.; Heine, W. F.; Ciccone, D. N.; Rudolph, K. L.; Wu, X.; Chang, S.; Hai, H.; Ahearn, I. M.; Livingston, D. M.; Resnick, I.; Rosen, F.; Seemanova, E.; Jarolim, P.; DePinho, R. A. and Weaver, D. T. (2001): Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit, *Curr Biol* 11 [12], pp. 962-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11448772](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11448772)
- [58] Zhu, X. D.; Niedernhofer, L.; Kuster, B.; Mann, M.; Hoeijmakers, J. H. and de Lange, T. (2003): ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes, *Mol Cell* 12 [6], pp. 1489-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14690602](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14690602)

- [59] Liu, D.; O'Connor, M. S.; Qin, J. and Songyang, Z. (2004): Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins, *J Biol Chem* 279 [49], pp. 51338-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15383534](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15383534)
- [60] Garg, P. and Burgers, P. M. (2005): DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40 [2], pp. 115-28. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15814431](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15814431)
- [61] MacNeill, S. A. (2001): DNA replication: partners in the Okazaki two-step, *Curr Biol* 11 [20], pp. R842-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11676941](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11676941)
- [62] Bambara, R. A.; Murante, R. S. and Henricksen, L. A. (1997): Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork, *J Biol Chem* 272 [8], pp. 4647-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9081985](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9081985)
- [63] Waga, S. and Stillman, B. (1998): The DNA replication fork in eukaryotic cells, *Annu Rev Biochem* 67, pp. 721-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9759502](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759502)
- [64] Hubscher, U.; Maga, G. and Spadari, S. (2002): Eukaryotic DNA polymerases, *Annu Rev Biochem* 71, pp. 133-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12045093](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12045093)
- [65] Muzi-Falconi, M.; Giannattasio, M.; Foiani, M. and Plevani, P. (2003): The DNA polymerase alpha-primase complex: multiple functions and interactions, *ScientificWorldJournal* 3, pp. 21-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12806117](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12806117)
- [66] Pursell, Z. F.; Isoz, I.; Lundstrom, E. B.; Johansson, E. and Kunkel, T. A. (2007): Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication, *Science* 317 [5834], pp. 127-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17615360](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17615360)
- [67] Ohki, R.; Tsurimoto, T. and Ishikawa, F. (2001): In vitro reconstitution of the end replication problem, *Mol Cell Biol* 21 [17], pp. 5753-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11486015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11486015)
- [68] Chakhparonian, M. and Wellinger, R. J. (2003): Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected?, *Trends Genet* 19 [8], pp. 439-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12902162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12902162)
- [69] Price, C. M. (1997): Synthesis of the telomeric C-strand. A review, *Biochemistry (Mosc)* 62 [11], pp. 1216-23. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9467845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9467845)
- [70] Dionne, I. and Wellinger, R. J. (1996): Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [24], pp. 13902-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8943033](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8943033)
- [71] Jacob, N. K.; Kirk, K. E. and Price, C. M. (2003): Generation of telomeric G strand overhangs involves both G and C strand cleavage, *Mol Cell* 11 [4], pp. 1021-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12718887](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12718887)
- [72] Jacob, N. K.; Skopp, R. and Price, C. M. (2001): G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres, *Embo J* 20 [15], pp. 4299-308. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11483532](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11483532)
- [73] Wellinger, R. J.; Wolf, A. J. and Zakian, V. A. (1992): Use of non-denaturing Southern hybridization and two dimensional agarose gels to detect putative intermediates in telomere replication in *Saccharomyces cerevisiae*, *Chromosoma* 102 [1 Suppl], pp. S150-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1291236](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1291236)
- [74] Wellinger, R. J.; Wolf, A. J. and Zakian, V. A. (1993): *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase, *Cell* 72 [1], pp. 51-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8422682](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8422682)
- [75] Chai, W.; Shay, J. W. and Wright, W. E. (2005): Human telomeres maintain their overhang length at senescence, *Mol Cell Biol* 25 [6], pp. 2158-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15743814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15743814)
- [76] Huffman, K. E.; Levene, S. D.; Tesmer, V. M.; Shay, J. W. and Wright, W. E. (2000): Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang, *J Biol Chem* 275 [26], pp. 19719-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10787419](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10787419)
- [77] Makarov, V. L.; Hirose, Y. and Langmore, J. P. (1997): Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening, *Cell* 88 [5], pp. 657-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9054505](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054505)
- [78] McElligott, R. and Wellinger, R. J. (1997): The terminal DNA structure of mammalian chromosomes, *Embo J* 16 [12], pp. 3705-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9218811](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9218811)
- [79] Wright, W. E.; Tesmer, V. M.; Huffman, K. E.; Levene, S. D. and Shay, J. W. (1997): Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end, *Genes Dev* 11 [21], pp. 2801-9. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9353250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353250)
- [80] Lindsey, J.; McGill, N. I.; Lindsey, L. A.; Green, D. K. and Cooke, H. J. (1991): In vivo loss of telomeric repeats with age in humans, *Mutat Res* 256 [1], pp. 45-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1944386](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1944386)
- [81] Hastie, N. D.; Dempster, M.; Dunlop, M. G.; Thompson, A. M.; Green, D. K. and Allshire, R. C. (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing, *Nature* 346 [6287], pp. 866-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2392154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2392154)
- [82] de Lange, T.; Shiue, L.; Myers, R. M.; Cox, D. R.; Naylor, S. L.; Killery, A. M. and Varmus, H. E. (1990): Structure and variability of human chromosome ends, *Mol Cell Biol* 10 [2], pp. 518-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2300052](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2300052)
- [83] Kurz, T.; Leake, A.; von Zglinicki, T. and Brunk, U. T. (2004): Lysosomal redox-active iron is important for oxidative stress-induced DNA damage, *Ann N Y Acad Sci* 1019, pp. 285-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15247030](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15247030)
- [84] Forsyth, N. R.; Evans, A. P.; Shay, J. W. and Wright, W. E. (2003): Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase, *Aging Cell* 2 [5], pp. 235-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14570231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14570231)
- [85] von Zglinicki, T. (2002): Oxidative stress shortens telomeres, *Trends Biochem Sci* 27 [7], pp. 339-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12114022](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12114022)
- [86] Serra, V.; von Zglinicki, T.; Lorenz, M. and Saretzki, G. (2003): Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening, *J Biol Chem* 278 [9], pp. 6824-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12475988](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12475988)
- [87] Tchirkov, A. and Lansdorp, P. M. (2003): Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia, *Hum Mol Genet* 12 [3], pp. 227-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12554677](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12554677)
- [88] Oikawa, S. and Kawanishi, S. (1999): Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening, *FEBS Lett* 453 [3], pp. 365-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10405177](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10405177)
- [89] Kawanishi, S. and Oikawa, S. (2004): Mechanism of telomere shortening by oxidative stress, *Ann N Y Acad Sci* 1019, pp. 278-84. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15247029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15247029)
- [90] Petersen, S.; Saretzki, G. and von Zglinicki, T. (1998): Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts, *Exp Cell Res* 239 [1], pp. 152-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9511733](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9511733)
- [91] von Zglinicki, T.; Pilger, R. and Sitte, N. (2000): Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts, *Free Radic Biol Med* 28 [1], pp. 64-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10656292](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10656292)
- [92] Kruk, P. A.; Rampino, N. J. and Bohr, V. A. (1995): DNA damage and repair in telomeres: relation to aging, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [1], pp. 258-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7816828](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7816828)
- [93] von Zglinicki, T. (2000): Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence, *Ann N Y Acad Sci* 908, pp. 99-110. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10911951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10911951)
- [94] Hayflick, L. (1965): The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains, *Exp Cell Res* 37, pp. 614-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14315085](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14315085)
- [95] Hara, E.; Tsurui, H.; Shinozaki, A.; Nakada, S. and Oda, K. (1991): Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, *TIG-1, Biochem Biophys Res Commun* 179 [1], pp. 528-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1909121](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1909121)
- [96] Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M. and Shay, J. W. (1989): Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts, *Mol Cell Biol* 9 [7], pp. 3088-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2779554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2779554)
- [97] Shay, J. W.; Pereira-Smith, O. M. and Wright, W. E. (1991): A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence, *Exp Cell Res* 196 [1], pp. 33-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1652450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1652450)
- [98] Shay, J. W.; Wright, W. E. and Werbin, H. (1991): Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization, *Biochim Biophys Acta* 1072 [1], pp. 1-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1850299](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1850299)
- [99] Sherr, C. J. and DePinho, R. A. (2000): Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?, *Cell* 102 [4], pp. 407-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10966103](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10966103)

- [100] Shay, J. W. and Wright, W. E. (2005): Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase, *Carcinogenesis* 26 [5], pp. 867-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15471900](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15471900)
- [101] Bryan, T. M.; Englezou, A.; Dalla-Pozza, L.; Dunham, M. A. and Reddel, R. R. (1997): Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines, *Nat Med* 3 [11], pp. 1271-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9359704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9359704)
- [102] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1987): The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity, *Cell* 51 [6], pp. 887-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3319189](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3319189)
- [103] Beattie, T. L.; Zhou, W.; Robinson, M. O. and Harrington, L. (1998): Reconstitution of human telomerase activity in vitro, *Curr Biol* 8 [3], pp. 177-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9443919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9443919)
- [104] Weinrich, S. L.; Pruzan, R.; Ma, L.; Ouellette, M.; Tesmer, V. M.; Holt, S. E.; Bodnar, A. G.; Lichtsteiner, S.; Kim, N. W.; Trager, J. B.; Taylor, R. D.; Carlos, R.; Andrews, W. H.; Wright, W. E.; Shay, J. W.; Harley, C. B. and Morin, G. B. (1997): Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT, *Nat Genet* 17 [4], pp. 498-502. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9398860](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9398860)
- [105] Yi, X.; Tesmer, V. M.; Savre-Train, I.; Shay, J. W. and Wright, W. E. (1999): Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels, *Mol Cell Biol* 19 [6], pp. 3989-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10330139](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10330139)
- [106] Kelleher, C.; Teixeira, M. T.; Forstemann, K. and Lingner, J. (2002): Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate, *Trends Biochem Sci* 27 [11], pp. 572-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12417133](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12417133)
- [107] Armbruster, B. N.; Banik, S. S.; Guo, C.; Smith, A. C. and Counter, C. M. (2001): N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo, *Mol Cell Biol* 21 [22], pp. 7775-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11604512](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11604512)
- [108] Banik, S. S.; Guo, C.; Smith, A. C.; Margolis, S. S.; Richardson, D. A.; Tirado, C. A. and Counter, C. M. (2002): C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity, *Mol Cell Biol* 22 [17], pp. 6234-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12167716](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12167716)

- [109] Armbruster, B. N.; Etheridge, K. T.; Broccoli, D. and Counter, C. M. (2003): Putative telomere-recruiting domain in the catalytic subunit of human telomerase, *Mol Cell Biol* 23 [9], pp. 3237-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12697823](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12697823)
- [110] Armbruster, B. N.; Linardic, C. M.; Veldman, T.; Bansal, N. P.; Downie, D. L. and Counter, C. M. (2004): Rescue of an hTERT mutant defective in telomere elongation by fusion with hPot1, *Mol Cell Biol* 24 [8], pp. 3552-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15060173](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15060173)
- [111] Lee, S. R.; Wong, J. M. and Collins, K. (2003): Human telomerase reverse transcriptase motifs required for elongation of a telomeric substrate, *J Biol Chem* 278 [52], pp. 52531-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14565961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14565961)
- [112] Moriarty, T. J.; Ward, R. J.; Taboski, M. A. and Autexier, C. (2005): An anchor site-type defect in human telomerase that disrupts telomere length maintenance and cellular immortalization, *Mol Biol Cell* 16 [7], pp. 3152-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15857955](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15857955)
- [113] Morin, G. B. (1989): The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats, *Cell* 59 [3], pp. 521-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2805070](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2805070)
- [114] Greider, C. W. (1991): Telomerase is processive, *Mol Cell Biol* 11 [9], pp. 4572-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1875940](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1875940)
- [115] Collins, K. (1999): Ciliate telomerase biochemistry, *Annu Rev Biochem* 68, pp. 187-218. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10872448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10872448)
- [116] Peng, Y.; Mian, I. S. and Lue, N. F. (2001): Analysis of telomerase processivity: mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance, *Mol Cell* 7 [6], pp. 1201-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11430823](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11430823)
- [117] Lue, N. (2002), *Telomeres and Telomerases: Cancer and Biology*, pp. 239-258.
- [118] Greider, C. W. (1996): Telomere length regulation, *Annu Rev Biochem* 65, pp. 337-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8811183](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8811183)
- [119] Autexier, C. and Lue, N. F. (2006): The structure and function of telomerase reverse transcriptase, *Annu Rev Biochem* 75, pp. 493-517. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16756500](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16756500)



- [120] Hammond, P. W.; Lively, T. N. and Cech, T. R. (1997): The anchor site of telomerase from *Euplotes aediculatus* revealed by photo-cross-linking to single- and double-stranded DNA primers, *Mol Cell Biol* 17 [1], pp. 296-308. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8972210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8972210)
- [121] Lue, N. F. (2005): A physical and functional constituent of telomerase anchor site, *J Biol Chem* 280 [28], pp. 26586-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15905172](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15905172)
- [122] Jacobs, S. A.; Podell, E. R. and Cech, T. R. (2006): Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase, *Nat Struct Mol Biol* 13 [3], pp. 218-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16462747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16462747)
- [123] Wyatt, H. D.; Lobb, D. A. and Beattie, T. L. (2007): Characterization of physical and functional anchor site interactions in human telomerase, *Mol Cell Biol* 27 [8], pp. 3226-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17296728](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17296728)
- [124] Blackburn, E. H. (1991): Structure and function of telomeres, *Nature* 350 [6319], pp. 569-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1708110](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1708110)
- [125] Blackburn, E. H. and C.W., Greider (1995), *Telomeres*, Cold Spring Harbor Press.
- [126] Lee, Y. H. and Vacquier, V. D. (1992): Reusable cDNA libraries coupled to magnetic beads, *Anal Biochem* 206 [1], pp. 206-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1456435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1456435)
- [127] Sun, D.; Lopez-Guajardo, C. C.; Quada, J.; Hurley, L. H. and Von Hoff, D. D. (1999): Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase, *Biochemistry* 38 [13], pp. 4037-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10194316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10194316)
- [128] Counter, C. M.; Ailion, A. A.; LeFeuvre, C. E.; Stewart, N. G.; Greider, C. W.; Harley, C. B. and Bacchetti, S. (1992): Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity, *Embo J* 11 [5], pp. 1921-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1582420](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1582420)
- [129] Counter, C. M.; Botelho, F. M.; Wang, P.; Harley, C. B. and Bacchetti, S. (1994): Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes, *J Virol* 68 [5], pp. 3410-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8151802](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8151802)
- [130] Counter, C. M.; Hirte, H. W.; Bacchetti, S. and Harley, C. B. (1994): Telomerase activity in human ovarian carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [8], pp. 2900-4.

- URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8159676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8159676)
- [131] Strahl, C. and Blackburn, E. H. (1996): Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines, *Mol Cell Biol* 16 [1], pp. 53-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8524329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8524329)
  - [132] Strahl, C. and Blackburn, E. H. (1994): The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in *Tetrahymena*, *Nucleic Acids Res* 22 [6], pp. 893-900. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8152919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8152919)
  - [133] Mantell, L. L. and Greider, C. W. (1994): Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*, *Embo J* 13 [13], pp. 3211-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8039513](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8039513)
  - [134] Fajkus, J.; Kovarik, A. and Kralovics, R. (1996): Telomerase activity in plant cells, *FEBS Lett* 391 [3], pp. 307-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8764995](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8764995)
  - [135] Cano, M. I.; Dungan, J. M.; Agabian, N. and Blackburn, E. H. (1999): Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [7], pp. 3616-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10097086](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10097086)
  - [136] Fajkus, J. (2006): Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives, *Clin Chim Acta* 371 [1-2], pp. 25-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16616059](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16616059)
  - [137] Krupp, G.; Kuhne, K.; Tamm, S.; Klapper, W.; Heidorn, K.; Rott, A. and Parwaresch, R. (1997): Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay, *Nucleic Acids Res* 25 [4], pp. 919-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9016650](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9016650)
  - [138] Wright, W. E.; Shay, J. W. and Piatyszek, M. A. (1995): Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity, *Nucleic Acids Res* 23 [18], pp. 3794-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7479015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7479015)
  - [139] Aldous, W. K. and Grabill, N. R. (1997): A fluorescent method for detection of telomerase activity, *Diagn Mol Pathol* 6 [2], pp. 102-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9098649](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9098649)
  - [140] Fajkus, J.; Fulneckova, J.; Hulanova, M.; Berkova, K.; Riha, K. and Matyasek, R. (1998): Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths, *Mol Gen Genet* 260 [5], pp. 470-4. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9894917](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9894917)
- [141] Riha, K.; Fajkus, J.; Siroky, J. and Vyskot, B. (1998): Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants, *Plant Cell* 10 [10], pp. 1691-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9761795](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9761795)
- [142] Thurnher, D.; Knerer, B.; Formanek, M. and Kornfehl, J. (1998): Non-radioactive semiquantitative testing for the expression levels of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinomas may be indicative for biological tumour behaviour, *Acta Otolaryngol* 118 [3], pp. 423-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9655221](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9655221)
- [143] Savoysky, E.; Akamatsu, K.; Tsuchiya, M. and Yamazaki, T. (1996): Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA), *Nucleic Acids Res* 24 [6], pp. 1175-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8604356](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8604356)
- [144] Hirose, M.; Abe-Hashimoto, J.; Ogura, K.; Tahara, H.; Ide, T. and Yoshimura, T. (1997): A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol, *J Cancer Res Clin Oncol* 123 [6], pp. 337-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9222300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9222300)
- [145] Uehara, H.; Nardone, G.; Nazarenko, I. and Hohman, R. J. (1999): Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection, *Biotechniques* 26 [3], pp. 552-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10090999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10090999)
- [146] Mayfield, M. P.; Shah, T.; Flannigan, G. M.; Hamilton Stewart, P. A. and Bibby, M. C. (1998): Telomerase activity in malignant and benign bladder conditions, *Int J Mol Med* 1 [5], pp. 835-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9852304](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9852304)
- [147] Hoos, A.; Hepp, H. H.; Kaul, S.; Ahlert, T.; Bastert, G. and Wallwiener, D. (1998): Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer, *Int J Cancer* 79 [1], pp. 8-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9495350](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9495350)
- [148] Elmore, L. W.; Forsythe, H. L.; Ferreira-Gonzalez, A.; Garrett, C. T.; Clark, G. M. and Holt, S. E. (2002): Real-time quantitative analysis of telomerase activity in breast tumor specimens using a highly specific and sensitive fluorescent-based assay, *Diagn Mol Pathol* 11 [3], pp. 177-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12218458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12218458)
- [149] Fajkus, J.; Koppova, K. and Kunicka, Z. (2003): Dual-color real-time telomeric repeat amplification protocol, *Biotechniques* 35 [5], pp. 912-4. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14628661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14628661)
- [150] Ohyashiki, K.; Ohyashiki, J. H.; Nishimaki, J.; Toyama, K.; Ebihara, Y.; Kato, H.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (1997): Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay, *Cancer Res* 57 [11], pp. 2100-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9187102](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9187102)
- [151] Hirose, M.; Abe-Hashimoto, J.; Tahara, H.; Ide, T. and Yoshimura, T. (1998): New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay, *Clin Chem* 44 [12], pp. 2446-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9836711](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9836711)
- [152] Xu, S. Q.; He, M.; Yu, H. P.; Wang, X. Y.; Tan, X. L.; Lu, B.; Sun, X.; Zhou, Y. K.; Yao, Q. F.; Xu, Y. J. and Zhang, Z. R. (2002): Bioluminescent method for detecting telomerase activity, *Clin Chem* 48 [7], pp. 1016-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12089169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12089169)
- [153] Schmidt, P. M.; Lehmann, C.; Matthes, E. and Bier, F. F. (2002): Detection of activity of telomerase in tumor cells using fiber optical biosensors, *Biosens Bioelectron* 17 [11-12], pp. 1081-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12392959](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12392959)
- [154] Schmidt, P. M.; Matthes, E.; Scheller, F. W.; Bienert, M.; Lehmann, C.; Ehrlich, A. and Bier, F. F. (2002): Real-time determination of telomerase activity in cell extracts using an optical biosensor, *Biol Chem* 383 [10], pp. 1659-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12452442](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12452442)
- [155] Maesawa, C.; Inaba, T.; Sato, H.; Iijima, S.; Ishida, K.; Terashima, M.; Sato, R.; Suzuki, M.; Yashima, A.; Ogasawara, S.; Oikawa, H.; Sato, N.; Saito, K. and Masuda, T. (2003): A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance, *Nucleic Acids Res* 31 [2], pp. E4-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12527793](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12527793)
- [156] Hahn, W. C. (2005): Telomere and telomerase dynamics in human cells, *Curr Mol Med* 5 [2], pp. 227-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15974877](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15974877)
- [157] Broccoli, D.; Young, J. W. and de Lange, T. (1995): Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [20], pp. 9082-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7568077](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7568077)
- [158] Counter, C. M.; Gupta, J.; Harley, C. B.; Leber, B. and Bacchetti, S. (1995): Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies, *Blood* 85 [9], pp. 2315-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7727765](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7727765)

- [159] Hiyama, K.; Hirai, Y.; Kyoizumi, S.; Akiyama, M.; Hiyama, E.; Piatyszek, M. A.; Shay, J. W.; Ishioka, S. and Yamakido, M. (1995): Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells, *J Immunol* 155 [8], pp. 3711-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7561072](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7561072)
- [160] Hiyama, E.; Hiyama, K.; Tatsumoto, N.; Kodama, T.; Shay, J. W. and Yokoyama, T. (1996): Telomerase activity in human intestine, *Int J Oncol* 9, pp. 453-458.
- [161] Takubo, K.; Nakamura, K.; Izumiyama, N.; Mafune, K.; Tanaka, Y.; Miyashita, M.; Sasajima, K.; Kato, M. and Oshimura, M. (1997): Telomerase activity in esophageal carcinoma, *J Surg Oncol* 66 [2], pp. 88-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9354162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9354162)
- [162] Bonatz, G.; Klapper, W.; Barthe, A.; Heidorn, K.; Jonat, W.; Krupp, G. and Parwaresch, R. (1998): Analysis of telomerase expression and proliferative activity in the different layers of cyclic endometrium, *Biochem Biophys Res Commun* 253 [2], pp. 214-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9878518](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9878518)
- [163] Kyo, S.; Takakura, M.; Kohama, T. and Inoue, M. (1997): Telomerase activity in human endometrium, *Cancer Res* 57 [4], pp. 610-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9044835](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9044835)
- [164] Brien, T. P.; Kallakury, B. V.; Lowry, C. V.; Ambros, R. A.; Muraca, P. J.; Malfetano, J. H. and Ross, J. S. (1997): Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma, *Cancer Res* 57 [13], pp. 2760-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9205088](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9205088)
- [165] Harle-Bachor, C. and Boukamp, P. (1996): Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [13], pp. 6476-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8692840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8692840)
- [166] Yasumoto, S.; Kunimura, C.; Kikuchi, K.; Tahara, H.; Ohji, H.; Yamamoto, H.; Ide, T. and Utakoji, T. (1996): Telomerase activity in normal human epithelial cells, *Oncogene* 13 [2], pp. 433-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8710384](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8710384)
- [167] Yui, J.; Chiu, C. P. and Lansdorp, P. M. (1998): Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow, *Blood* 91 [9], pp. 3255-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9558381](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9558381)
- [168] Shay, J. W.; Werbin, H. and Wright, W. E. (1996): Telomeres and telomerase in human leukemias, *Leukemia* 10 [8], pp. 1255-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8709628](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8709628)
- [169] Granger, M. P.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (2002): Telomerase in cancer and aging, *Crit Rev Oncol Hematol* 41 [1], pp. 29-40. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11796230](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11796230)
- [170] Ulaner, G. A. (2004): Telomere maintenance in clinical medicine, *Am J Med* 117 [4], pp. 262-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15308436](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15308436)
- [171] Hiyama, E. and Hiyama, K. (2002): Clinical utility of telomerase in cancer, *Oncogene* 21 [4], pp. 643-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11850791](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11850791)
- [172] Falchetti, M. L.; Pallini, R.; Larocca, L. M.; Verna, R. and D'Ambrosio, E. (1999): Telomerase expression in intracranial tumours: prognostic potential for malignant gliomas and meningiomas, *J Clin Pathol* 52 [3], pp. 234-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10450187](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10450187)
- [173] Langford, L. A.; Piatyszek, M. A.; Xu, R.; Schold, S. C., Jr.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (1997): Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome, *Hum Pathol* 28 [4], pp. 416-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9104940](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9104940)
- [174] Matthews, P.; Jones, C. J.; Skinner, J.; Haughton, M.; de Micco, C. and Wynford-Thomas, D. (2001): Telomerase activity and telomere length in thyroid neoplasia: biological and clinical implications, *J Pathol* 194 [2], pp. 183-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11400147](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11400147)
- [175] Pearson, A. S.; Chiao, P.; Zhang, L.; Zhang, W.; Larry, L.; Katz, R. L.; Evans, D. B. and Abbruzzese, J. L. (2000): The detection of telomerase activity in patients with adenocarcinoma of the pancreas by fine needle aspiration, *Int J Oncol* 17 [2], pp. 381-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10891550](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10891550)
- [176] Lancelin, F.; Anidjar, M.; Villette, J. M.; Soliman, A.; Teillac, P.; Le Duc, A.; Fiet, J. and Cussenot, O. (2000): Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions, *BJU Int* 85 [4], pp. 526-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10691838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10691838)
- [177] Wisman, G. B.; Knol, A. J.; Helder, M. N.; Krans, M.; de Vries, E. G.; Hollema, H.; de Jong, S. and van der Zee, A. G. (2001): Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer, *Int J Cancer* 91 [5], pp. 658-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11267977](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11267977)
- [178] Hiyama, E.; Hiyama, K.; Yokoyama, T.; Matsuura, Y.; Piatyszek, M. A. and Shay, J. W. (1995): Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes, *Nat Med* 1 [3], pp. 249-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7585042](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7585042)

- [179] Hiyama, E.; Hiyama, K.; Ohtsu, K.; Yamaoka, H.; Ichikawa, T.; Shay, J. W. and Yokoyama, T. (1997): Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour?, *Eur J Cancer* 33 [12], pp. 1932-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9516827](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9516827)
- [180] Poremba, C.; Willenbring, H.; Hero, B.; Christiansen, H.; Schafer, K. L.; Brinkschmidt, C.; Jurgens, H.; Bocker, W. and Dockhorn-Dworniczak, B. (1999): Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis, *Ann Oncol* 10 [6], pp. 715-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10442195](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10442195)
- [181] Streutker, C. J.; Thorner, P.; Fabricius, N.; Weitzman, S. and Zielenska, M. (2001): Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas, *Pediatr Dev Pathol* 4 [1], pp. 62-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11200492](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11200492)
- [182] Hiyama, E.; Yokoyama, T.; Tatsumoto, N.; Hiyama, K.; Imamura, Y.; Murakami, Y.; Kodama, T.; Piatyszek, M. A.; Shay, J. W. and Matsuura, Y. (1995): Telomerase activity in gastric cancer, *Cancer Res* 55 [15], pp. 3258-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7614459](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7614459)
- [183] Chadeneau, C.; Hay, K.; Hirte, H. W.; Gallinger, S. and Bacchetti, S. (1995): Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer, *Cancer Res* 55 [12], pp. 2533-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7780964](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7780964)
- [184] Tahara, H.; Yasui, W.; Tahara, E.; Fujimoto, J.; Ito, K.; Tamai, K.; Nakayama, J.; Ishikawa, F. and Ide, T. (1999): Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections, *Oncogene* 18 [8], pp. 1561-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10102626](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10102626)
- [185] Tatsumoto, N.; Hiyama, E.; Murakami, Y.; Imamura, Y.; Shay, J. W.; Matsuura, Y. and Yokoyama, T. (2000): High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer, *Clin Cancer Res* 6 [7], pp. 2696-701. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10914712](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10914712)
- [186] Marchetti, A.; Bertacca, G.; Buttitta, F.; Chella, A.; Quattrocchio, G.; Angeletti, C. A. and Bevilacqua, G. (1999): Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res* 5 [8], pp. 2077-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10473089](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10473089)
- [187] Clark, G. M.; Osborne, C. K.; Levitt, D.; Wu, F. and Kim, N. W. (1997): Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer, *J Natl Cancer Inst* 89 [24], pp. 1874-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9414175](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9414175)

- [188] Shay, J. W. and Wright, W. E. (2002): Telomerase: a target for cancer therapeutics, *Cancer Cell* 2 [4], pp. 257-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12398889](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12398889)
- [189] Corey, D. R. (2000): Telomerase: an unusual target for cytotoxic agents, *Chem Res Toxicol* 13 [10], pp. 957-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11080041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11080041)
- [190] Shay, J. W. and Wright, W. E. (2006): Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions, *Nat Rev Drug Discov* 5 [7], pp. 577-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16773071](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16773071)
- [191] Tao, M.; Miyano-Kurosaki, N.; Takai, K. and Takaku, H. (1999): Specific inhibition of human telomerase activity by transfection reagent, FuGENE6-antisense phosphorothioate oligonucleotide complex in HeLa cells, *FEBS Lett* 454 [3], pp. 312-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10431829](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10431829)
- [192] Shammas, M. A.; Liu, X.; Gavory, G.; Raney, K. D.; Balasubramanian, S. and Shmookler Reis, R. J. (2004): Targeting the single-strand G-rich overhang of telomeres with PNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human immortal cells, *Exp Cell Res* 295 [1], pp. 204-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15051503](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15051503)
- [193] Elayadi, A. N.; Demieville, A.; Wancewicz, E. V.; Monia, B. P. and Corey, D. R. (2001): Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells, *Nucleic Acids Res* 29 [8], pp. 1683-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11292840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11292840)
- [194] Asai, A.; Oshima, Y.; Yamamoto, Y.; Uochi, T. A.; Kusaka, H.; Akinaga, S.; Yamashita, Y.; Pongracz, K.; Pruzan, R.; Wunder, E.; Piatyszek, M.; Li, S.; Chin, A. C.; Harley, C. B. and Gryaznov, S. (2003): A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent, *Cancer Res* 63 [14], pp. 3931-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12873987](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12873987)
- [195] Wang, E. S.; Wu, K.; Chin, A. C.; Chen-Kiang, S.; Pongracz, K.; Gryaznov, S. and Moore, M. A. (2004): Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: in vitro and in vivo studies in multiple myeloma and lymphoma, *Blood* 103 [1], pp. 258-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12969977](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12969977)
- [196] Tarkanyi, I.; Horvath, A.; Szatmari, I.; Eizert, H.; Vamosi, G.; Damjanovich, S.; Segal-Bendirdjian, E. and Aradi, J. (2005): Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide, *FEBS Lett* 579 [6], pp. 1411-6. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15733850](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15733850)
- [197] Matthes, E.; Lehmann, C.; Stulich, M.; Wu, Y.; Dimitrova, L.; Uhlmann, E. and Janta-Lipinski, M. V. (2005): Potent inhibitory activity of chimeric oligonucleotides targeting two different sites of human telomerase, *Oligonucleotides* 15 [4], pp. 255-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16396620](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16396620)
- [198] Yeo, M.; Rha, S. Y.; Jeung, H. C.; Hu, S. X.; Yang, S. H.; Kim, Y. S.; An, S. W. and Chung, H. C. (2005): Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozyme targeting human telomerase RNA induces growth retardation and apoptosis in human breast tumor cells, *Int J Cancer* 114 [3], pp. 484-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15551309](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15551309)
- [199] Shay, J. W. and Wright, W. E. (1996): Telomerase activity in human cancer, *Curr Opin Oncol* 8 [1], pp. 66-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8868103](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8868103)
- [200] Shay, J. W. and Wright, W. E. (1996): The reactivation of telomerase activity in cancer progression, *Trends Genet* 12 [4], pp. 129-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8901415](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8901415)
- [201] Holt, S. E. and Shay, J. W. (1999): Role of telomerase in cellular proliferation and cancer, *J Cell Physiol* 180 [1], pp. 10-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10362013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10362013)
- [202] Wright, W. E. and Shay, J. W. (2001): Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting, *Curr Opin Genet Dev* 11 [1], pp. 98-103. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11163158](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11163158)
- [203] Shay, J. W. (1995): Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection?, *Mol Med Today* 1 [8], pp. 378-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9415184](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9415184)
- [204] Shay, J. W.; Zou, Y.; Hiyama, E. and Wright, W. E. (2001): Telomerase and cancer, *Hum Mol Genet* 10 [7], pp. 677-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11257099](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11257099)
- [205] Matthes, E. and Lehmann, C. (1999): Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 27 [4], pp. 1152-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9927750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927750)
- [206] Norton, J. C.; Piatyszek, M. A.; Wright, W. E.; Shay, J. W. and Corey, D. R. (1996): Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids, *Nat Biotechnol* 14 [5], pp. 615-9. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9630953](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9630953)
- [207] Engler, M.J. and Richardson, C.C. (1982): The Enzymes.
- [208] Januszkiewicz, D.; Wysoki, J.; Lewandowski, K.; Pernak, M.; Nowicka, K.; Rembowska, J. and Nowak, J. (2003): Lack of correlation between telomere length and telomerase activity and expression in leukemic cells, *Int J Mol Med* 12 [6], pp. 935-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14612969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612969)
- [209] Kameshima, H.; Yagihashi, A.; Yajima, T.; Kobayashi, D.; Hirata, K. and Watanabe, N. (2001): Expression of telomerase-associated genes: reflection of telomerase activity in gastric cancer?, *World J Surg* 25 [3], pp. 285-9, iv. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11343177](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11343177)
- [210] Abramoff, M.D.; Magehaes, P.J. and Ram, S.J. (2004): Image Processing with ImageJ, *Biophotonics International* 11 [7], pp. 36-42.
- [211] Nilsson, M.; Antson, D. O.; Barbany, G. and Landegren, U. (2001): RNA-templated DNA ligation for transcript analysis, *Nucleic Acids Res* 29 [2], pp. 578-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11139629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11139629)
- [212] Nilsson, M.; Barbany, G.; Antson, D. O.; Gertow, K. and Landegren, U. (2000): Enhanced detection and distinction of RNA by enzymatic probe ligation, *Nat Biotechnol* 18 [7], pp. 791-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10888852](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10888852)
- [213] Hoffman, R; Lin, B.H. and Miller, K (2001): Using ImProm-II Reverse Transcription System to Generate Fluorescently Labeled Probes, *Promega eNotes-Applications*. URL: [http://www.promega.com/enotes/applications/ap0033\\_print.htm](http://www.promega.com/enotes/applications/ap0033_print.htm)
- [214] Novakovic, S.; Hocevar, M.; Zgajnar, J.; Besic, N. and Stegel, V. (2004): Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer, *Oncol Rep* 11 [1], pp. 245-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14654933](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14654933)
- [215] Fuller, R. A.; Clark, J.; Kretzner, L.; Korns, D.; Blair, S. L.; Crocitto, L. E. and Smith, S. S. (2003): Use of microfluidics chips for the detection of human telomerase RNA, *Anal Biochem* 313 [2], pp. 331-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12605872](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12605872)
- [216] Chen, X. Q.; Bonnefoi, H.; Pelte, M. F.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Movarekhi, S.; Schaeffer, P.; Mulcahy, H. E.; Meyer, P.; Stroun, M. and Anker, P. (2000): Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients, *Clin Cancer Res* 6 [10], pp. 3823-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11051224](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11051224)
- [217] Pascolo, E.; Wenz, C.; Lingner, J.; Haul, N.; Priepke, H.; Kauffmann, I.; Garin-Chesa, P.; Rettig, W. J.; Damm, K. and Schnapp, A. (2002): Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate, *J*

- Biol Chem 277 [18], pp. 15566-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11854300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11854300)
- [218] Wenz, C.; Enenkel, B.; Amacker, M.; Kelleher, C.; Damm, K. and Lingner, J. (2001): Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules, *Embo J* 20 [13], pp. 3526-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11432839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11432839)
- [219] Francis, R. and Friedman, S. H. (2002): A rapid direct telomerase assay method using 96-well streptavidin plates, *Biotechniques* 32 [5], pp. 1154-6, 1158, 1160. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12019789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12019789)
- [220] McPherson, M.; Yang, Y.; Hammond, P. W. and Kreider, B. L. (2002): Drug receptor identification from multiple tissues using cellular-derived mRNA display libraries, *Chem Biol* 9 [6], pp. 691-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12079780](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12079780)
- [221] Yoshida, A.; Pourquier, P. and Pommier, Y. (1998): Purification and characterization of a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease (AN34) from etoposide-treated human leukemia HL-60 cells undergoing apoptosis, *Cancer Res* 58 [12], pp. 2576-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9635581](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9635581)
- [222] Sutton, D.W.; Havstad, P.K. and Kemp, J.D. (1995): Rapid Gene Synthesis Using Ampligase Thermostable DNA Ligase, *EPICENTRE Forum* 2 2 [2].
- [223] Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Methods Mol Biol* 132, pp. 365-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10547847](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10547847)
- [224] Pai, R. B.; Pai, S. B.; Kukhanova, M.; Dutschman, G. E.; Guo, X. and Cheng, Y. C. (1998): Telomerase from human leukemia cells: properties and its interaction with deoxynucleoside analogues, *Cancer Res* 58 [9], pp. 1909-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9581832](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9581832)
- [225] Schnapp, G.; Rodi, H. P.; Rettig, W. J.; Schnapp, A. and Damm, K. (1998): One-step affinity purification protocol for human telomerase, *Nucleic Acids Res* 26 [13], pp. 3311-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9628936](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9628936)
- [226] Nagao, K.; Katsumata, K.; Aizawa, Y.; Saito, N.; Hirata, H.; Sasaki, H.; Yamamoto, S.; Hikiji, K.; Koiwa, T. and Hisatomi, H. (2004): Differential alternative splicing expressions of telomerase reverse transcriptase in gastrointestinal cell lines, *Oncol Rep* 11 [1], pp. 127-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14654914](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14654914)
- [227] Karboord, B. and Liermann, R. (2006): Biotinylated DNA binding capacities of Pierce avidin supports, *PIERCE Application Notes* [AN0014.0].

- [228] Faulhammer, D.; Lipton, R. J. and Landweber, L. F. (2000): Fidelity of enzymatic ligation for DNA computing, *J Comput Biol* 7 [6], pp. 839-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11382365](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11382365)
- [229] Rossi, R.; Montecucco, A.; Ciarrocchi, G. and Biamonti, G. (1997): Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action, *Nucleic Acids Res* 25 [11], pp. 2106-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9153309](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153309)
- [230] Yoo, J.; Park, S. Y.; Kang, S. J.; Kim, B. K.; Shim, S. I. and Kang, C. S. (2003): Expression of telomerase activity, human telomerase RNA, and telomerase reverse transcriptase in gastric adenocarcinomas, *Mod Pathol* 16 [7], pp. 700-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12861067](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12861067)
- [231] Eccleston, M.; Ali, R. A.; Seyler, R.; Westpheling, J. and Nodwell, J. (2002): Structural and genetic analysis of the BldB protein of *Streptomyces coelicolor*, *J Bacteriol* 184 [15], pp. 4270-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12107145](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12107145)
- [232] Yuan, C.; Lou, X. W.; Rhoades, E.; Chen, H. and Archer, L. A. (2007): T4 DNA ligase is more than an effective trap of cyclized dsDNA, *Nucleic Acids Res* 35 [16], pp. 5294-302. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17686784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17686784)
- [233] Kuhn, H. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2005): Template-independent ligation of single-stranded DNA by T4 DNA ligase, *Febs J* 272 [23], pp. 5991-6000. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16302964](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16302964)
- [234] Hsuih, T. C.; Park, Y. N.; Zaretsky, C.; Wu, F.; Tyagi, S.; Kramer, F. R.; Sperling, R. and Zhang, D. Y. (1996): Novel, ligation-dependent PCR assay for detection of hepatitis C in serum, *J Clin Microbiol* 34 [3], pp. 501-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8904402](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8904402)
- [235] Park, Y. N.; Abe, K.; Li, H.; Hsuih, T.; Thung, S. N. and Zhang, D. Y. (1996): Detection of hepatitis C virus RNA using ligation-dependent polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues, *Am J Pathol* 149 [5], pp. 1485-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8909238](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8909238)
- [236] Miyauchi, I.; Moriyama, M.; Zhang, D. Y. and Abe, K. (1998): Further study of hepatitis C virus RNA detection in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues by ligation-dependent polymerase chain reaction, *Pathol Int* 48 [6], pp. 428-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9702854](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9702854)
- [237] Bullard, D. R. and Bowater, R. P. (2006): Direct comparison of nick-joining activity of the nucleic acid ligases from bacteriophage T4, *Biochem J* 398 [1], pp. 135-44. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16671895](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16671895)
- [238] Eulberg, D.; Buchner, K.; Maasch, C. and Klussmann, S. (2005): Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist, *Nucleic Acids Res* 33 [4], p. e45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15745995](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15745995)
- [239] Wilson, D. (1998): Using Immobilized Streptavidin, *Protocols of the Szostak Lab*. URL: <http://genetics.mgh.harvard.edu/szostakweb/protocols.html>
- [240] Wick, M.; Zubov, D. and Hagen, G. (1999): Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT), *Gene* 232 [1], pp. 97-106. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10333526](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10333526)
- [241] Nakayama, J.; Tahara, H.; Tahara, E.; Saito, M.; Ito, K.; Nakamura, H.; Nakanishi, T.; Ide, T. and Ishikawa, F. (1998): Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas, *Nat Genet* 18 [1], pp. 65-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9425903](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9425903)
- [242] Kilian, A.; Bowtell, D. D.; Abud, H. E.; Hime, G. R.; Venter, D. J.; Keese, P. K.; Duncan, E. L.; Reddel, R. R. and Jefferson, R. A. (1997): Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types, *Hum Mol Genet* 6 [12], pp. 2011-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9328464](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9328464)
- [243] Ouellette, M. M.; Aisner, D. L.; Savre-Train, I.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (1999): Telomerase activity does not always imply telomere maintenance, *Biochem Biophys Res Commun* 254 [3], pp. 795-803. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9920820](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9920820)
- [244] Counter, C. M.; Hahn, W. C.; Wei, W.; Caddle, S. D.; Beijersbergen, R. L.; Lansdorp, P. M.; Sedivy, J. M. and Weinberg, R. A. (1998): Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [25], pp. 14723-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9843956](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9843956)
- [245] Yi, X.; White, D. M.; Aisner, D. L.; Baur, J. A.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (2000): An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity, *Neoplasia* 2 [5], pp. 433-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11191110](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11191110)
- [246] Hisatomi, H.; Ohyashiki, K.; Ohyashiki, J. H.; Nagao, K.; Kanamaru, T.; Hirata, H.; Hibi, N. and Tsukada, Y. (2003): Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene, *Neoplasia* 5 [3], pp. 193-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12869302](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12869302)

- [247] Saeboe-Larssen, S.; Fossberg, E. and Gaudernack, G. (2006): Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues, *BMC Mol Biol* 7, p. 26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16939641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16939641)
- [248] Bachand, F. and Autexier, C. (2001): Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions, *Mol Cell Biol* 21 [5], pp. 1888-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11238925](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11238925)
- [249] Fan, Y.; Liu, Z.; Fang, X.; Ge, Z.; Ge, N.; Jia, Y.; Sun, P.; Lou, F.; Bjorkholm, M.; Gruber, A.; Ekman, P. and Xu, D. (2005): Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues, *Clin Cancer Res* 11 [12], pp. 4331-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15958614](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15958614)
- [250] Holmes, J. L. and Pollenz, R. S. (1997): Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative Western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates, *Mol Pharmacol* 52 [2], pp. 202-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9271342](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9271342)
- [251] Hamalainen, M. M.; Eskola, J. U.; Hellman, J. and Pulkki, K. (1999): Major interference from leukocytes in reverse transcription-PCR identified as neurotoxin ribonuclease from eosinophils: detection of residual chronic myelogenous leukemia from cell lysates by use of an eosinophil-depleted cell preparation, *Clin Chem* 45 [4], pp. 465-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10102905](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10102905)
- [252] Stefanovic, D.; Stanojic, S.; Vindigni, A.; Ochem, A. and Falaschi, A. (2003): In vitro protein-DNA interactions at the human lamin B2 replication origin, *J Biol Chem* 278 [44], pp. 42737-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12902329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12902329)
- [253] Chen, S. M.; Tao, Z. Z.; Hua, Q. Q.; Liu, D.; Chi, H. M. and Cai, Q. (2006): Inhibition of human telomerase reverse transcriptase in hep-2 cells using short hairpin RNA expression vectors, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132 [2], pp. 200-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16490880](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16490880)
- [254] Wacker, M. J. and Godard, M. P. (2005): Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III, *J Biomol Tech* 16 [3], pp. 266-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16461951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16461951)
- [255] Loveday, R. L.; Greenman, J.; Drew, P. J.; Monson, J. R. and Kerin, M. J. (1999): Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer, *Int J Cancer* 84

- [5], pp. 516-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10502730](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10502730)
- [256] Mehle, C.; Lindblom, A.; Ljungberg, B.; Stenling, R. and Roos, G. (1998): Loss of heterozygosity at chromosome 3p correlates with telomerase activity in renal cell carcinoma, *Int J Oncol* 13 [2], pp. 289-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9664124](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9664124)
- [257] Wang, J.; Xie, L. Y.; Allan, S.; Beach, D. and Hannon, G. J. (1998): Myc activates telomerase, *Genes Dev* 12 [12], pp. 1769-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9637678](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9637678)
- [258] Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991): p53 mutations in human cancers, *Science* 253 [5015], pp. 49-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1905840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1905840)
- [259] Saretzki, G.; Petersen, S.; Petersen, I.; Kolble, K. and von Zglinicki, T. (2002): hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines, *Cancer Lett* 176 [1], pp. 81-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11790457](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11790457)

## **Publikationsliste**

### **Publikationen**

**Matthes, E., C. Lehmann, M. Stulich, Y. Wu, L. Dimitrova, E. Uhlmann, and M. V. Janta-Lipinski.** 2005. Potent inhibitory activity of chimeric oligonucleotides targeting two different sites of human telomerase. *Oligonucleotides* **15**:255-68.

### **Konferenzbeiträge**

**Dimitrova L., C. Lehmann, M. Stulich, Y. Wu, E. Uhlmann, M. V. Janta-Lipinski and E. Matthes.** 2005. Potent inhibitory activity of chimeric oligonucleotides targeting two different sites of human telomerase. Cold Spring Harbor Laboratory Conference on Telomeres and Telomerase, Cold Spring Harbor, New York, 4. – 8.05.2005

**Dimitrova L., Y. Wu, E. Uhlmann, M. V. Janta-Lipinski and E. Matthes.** 2005. RNA- and protein-addressing oligonucleotides as promising inhibitors of human telomerase. Jahrestagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Berlin, 18. – 21.09.2005



## **Danksagung**

Herrn Dr. Matthes danke ich für die Überlassung des interessanten Themas.

Die Versuche in dieser Arbeit wurden in der Zeit vom 01.10.2002-31.08.2007 am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin angefertigt. In der aufgeschlossenen, schöpferischen Atmosphäre dieser Forschungseinrichtung hat das Arbeiten allzeit großen Spaß gemacht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Börner für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Saumweber und Herrn Prof. Dr. von Zglinicki danke ich für die Übernahme der Korreferate.

Bei Herrn Dr. Bendzko von der Firma Invitek GmbH (Berlin) möchte ich mich herzlich für die finanzielle, materielle und sonstige Unterstützung, bei Herrn Dr. Heymann für die Betreuung und die Zeit, die er sich immer für mich genommen hat, bedanken. Ohne Sie beide wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Joos danke ich für die wertvollen Diskussionen.

Frau Bimmler möchte ich für die stetige Unterstützung danken.

Bei Frau Kraffert möchte ich mich für die Herstellung spezieller Zellpellets bedanken, bei Herrn Dr. Paulitschke von der Firma provitro GmbH (Berlin) für die Bereitstellung der HUVEC-Zellen.

Frau Dr. Fabricius danke ich für die anti-Telomerase Antikörper.

Boyka und Herrn Dr. Butschak danke ich für die Unterstützung und Freundschaft in all den Jahren.

Nana, Annette, Herrn Dr. Bünger und den Mitgliedern der AG Bader und AG Jung danke ich für ihre Kollegialität, Hilfsbereitschaft und für die netten Gespräche.

Christian danke ich von ganzem Herzen für alles.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den 01.09.2008